

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I + D ASOCIADA AL CNB-CSIC

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA /
INFLAMATORIA Y OXIDATIVA EN PACIENTES Y EN
UN MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE
INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE**

TESIS DOCTORAL

Alegría Cecilia Levy Guiffrida

ALCALÁ DE HENARES, 2011

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA /
INFLAMATORIA Y OXIDATIVA EN PACIENTES Y EN
UN MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE
INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE**

TESIS DOCTORAL

Alegría Cecilia Levy Guiffrida

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.

Nereida Valero
Catedrático de Medicina,
Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por estar siempre conmigo y darme la luz necesaria para lograr esta meta.
- A nuestra máxima casa de estudios, La Universidad del Zulia, especialmente al Vicerrectorado Académico, por brindarme la oportunidad de expandir nuevos conocimientos.
- A la Universidad de Alcalá, por darme la gran oportunidad de crecer profesionalmente.
- Al Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, por permitirme iniciar mis pasos en la investigación.
- A la Dra. Nereida Valero, por su orientación, demostración en cada momento de amistad y excelencia humana y por su apoyo y guía vital en cada paso para la elaboración de este trabajo.
- Al Dr. Jesús Mosquera, por su espíritu de colaboración y guía en todo momento.
- Al Dr. Melchor Álvarez de Mon Soto, por hacer realidad este programa de Doctorado y haberme brindado sus conocimientos y experiencias en todo momento.
- Al personal de la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas, por su amistad y gran espíritu de colaboración.
- A mi amiga Jenny Salazar, por recorrer este camino conmigo y hacerlo cada día más agradable.
- A mis compañeros del Departamento de Morfofisiopatología y a mis estudiantes por formar parte de este recorrido.
- Al personal del Hospital General del Sur, Hospital Materno-Infantil “Dr. Eduardo Soto Peña” y de la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza”, por su cooperación en la adquisición de las muestras empleadas para este trabajo.
- A FONACIT, y al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (LUZ-CONDES), por el financiamiento otorgado que me permitió culminar este proyecto.

- A mis hermanas Brenda y Esther, por estar siempre conmigo y brindarme su apoyo en todo momento.
- A Abraham, por estar conmigo en los momentos difíciles brindándome apoyo, incentivo, amor y comprensión.
- A Nico, por llegar a mi vida llenándola de tanta dulzura y amor.
- Especialmente a mis padres, que desde mis primeros pasos han estado allí y siempre han tenido fe en mí.
- Y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis amados padres Francisea y Yehuda
A mis mejores hermanas Brenda y Esther
A mí querido Abraham
A mí adorado Nico

ÍNDICE

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	
Summary	
I. Introducción	1
I.1.- Agente etiológico	2
I.2.- Epidemiología	3
I.2.1.- El vector: <i>Aedes aegypti</i>	4
I.2.1.1.- Ciclo biológico del <i>Aedes aegypti</i>	5
I.2.1.2.- Ecología del mosquito adulto	7
I.2.2.- Ciclos de transmisión del dengue	9
I.2.3.- Factores de riesgo	10
I.3.- Manifestaciones clínicas del dengue	11
I.3.1.- Fases de la enfermedad	15
I.4.- Prevención y control	20
I.5.- Patogénesis	25
I.5.1.- Factores virales	25
I.5.2.- Factores inmunitarios del huésped	28
I.5.2.1.- Observaciones epidemiológicas	28
I.5.2.2.- Efecto del DENV sobre plaquetas	30
I.5.2.3.- Efecto del DENV sobre células endoteliales	31
I.5.2.3.1.- Vasculopatía	31
I.5.2.3.2.- Coagulopatía	33
I.5.2.4.- El sistema de complemento	35
I.5.2.5.- Proteína C reactiva	35
I.5.2.6.- Efecto del DENV sobre monocitos	36
I.6.- Citoquinas	38
I.6.1.- Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α)	40
I.6.2.- Interleuquina 1 (IL-1)	42
I.6.3.- Interleuquina 6 (IL-6)	44

I.7.- Respuesta oxidativa ante la infección por virus dengue	47
I.7.1.- Radicales libres	47
I.7.1.1.- Óxido Nítrico	48
I.7.1.2.- Malondialdehído	50
I.7.2.- Antioxidantes	51
I.7.2.1.- Catalasa	52
I.7.2.2.- Superóxido dismutasa	53
I.7.2.3.- Glutación peroxidasa	54
I.8.- Apoptosis	55
I.9.- La edad como factor de riesgo en la infección por dengue	57
II. Hipótesis y Objetivos	60
III. Materiales y Métodos	65
III.1.- Población objeto de estudio	66
III.1.1.- Pacientes con dengue en fase aguda	66
III.1.1.1.- Criterios de inclusión	66
III.1.1.2.- Criterios de exclusión	66
III.1.1.3.- Clasificación según severidad clínica	67
III.1.1.3.1.- Dengue clásico	67
III.1.1.3.2.- Dengue hemorrágico	67
III.1.1.4.- Clasificación según tipo de infección	68
III.1.1.5.- Clasificación de los casos de DH	68
III.1.2.- Grupo control	68
III.1.2.1.- Controles sanos	68
III.2.- Toma de muestra	69
III.3.- Aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia indirecta	70
III.4.- Detección de anticuerpos específicos IgM e IgG anti-dengue	70
III.5.- Líneas celulares y virus	71
III.6.- Aislamiento y cultivo de monocitos	72
III.7.- Determinación de citoquinas en el suero y en sobrenadante de	

cultivo de monocitos	74
III.7.1.- Cuantificación de TNF- α , IL-6 e IL-1 β	74
III.8.- Determinación de proteínas del complemento (C3 y C4) en el suero de pacientes infectados por el virus dengue	75
III.9.- Determinación de Proteína C Reactiva en el suero de pacientes infectados por el virus dengue	76
III.10.- Determinación de la actividad de enzimas y metabolitos oxidativos (CAT, SOD, GSH, NO, MDA) en lisados celulares y sobrenadantes de cultivo de monocitos	77
III.10.1.- Determinación de actividad de catalasa	77
III.10.2.- Determinación de actividad de superóxido dismutasa	77
III.10.3.- Determinación de glutatión reducido	78
III.10.4.- Determinación de óxido nítrico	78
III.10.5.- Determinación de malondialdehído	79
III.11.- Determinación de proteínas	79
III.12.- Detección de apoptosis	80
III.13.- Análisis estadístico	81
IV. Resultados	82
IV.1.- Datos clínicos	83
IV.2.- Determinación de mediadores inflamatorios en pacientes con infección aguda por virus dengue	85
IV.2.1.- Determinación sérica de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β)	86
IV.2.1.1.- Citoquinas proinflamatorias según severidad de afectación y tipo de infección	86
IV.2.1.2.- Citoquinas proinflamatorias según severidad, grados de afectación y tipo de infección	88
IV.2.1.3.- Citoquinas proinflamatorias según el serotipo viral infectante	90
IV.2.2.- Determinación sérica de proteínas del complemento (C3 y	

C4)	91
IV.2.2.1.- Proteínas del complemento según severidad de afectación y tipo de infección	91
IV.2.2.2.- Proteínas del complemento según severidad, grados de afectación y tipo de infección	93
IV.2.2.3.- Proteínas del complemento según el serotipo viral infectante	94
IV.2.3.- Determinación sérica de proteína C reactiva	95
IV.2.3.1.- Proteína C reactiva según severidad de afectación y tipo de infección	95
IV.2.3.2.- Proteínas C reactiva según severidad, grados de afectación y tipo de infección	96
IV.2.3.3.- Proteína C reactiva según el serotipo viral infectante	97
IV.2.4.- Determinación sérica de óxido nítrico	98
IV.2.4.1.- Oxido nítrico según severidad de afectación y tipo de infección	98
IV.2.4.2.- Oxido nítrico según severidad, grados de afectación y tipo de infección	99
IV.2.4.3.- Oxido nítrico según el serotipo viral infectante	100
IV.3.- Análisis del efecto del DENV sobre la producción de citoquinas, antioxidantes y radicales libres en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos estimulados con LPS e infectados experimentalmente con virus dengue	101
IV.3.1.- Concentraciones de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β	102
IV.3.2.- Porcentaje de incremento en la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β	117
IV.3.3.- Niveles de antioxidantes CAT, SOD y GSH.	123

IV.3.4.- Concentraciones de NO	138
IV.3.5.- Concentraciones de MDA	143
IV.4.- Apoptosis en cultivo de monocitos estimulados con LPS e infectados por los serotipos del virus dengue a diferentes días post-infección	148
IV.4.1.- Apoptosis en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos	148
V.- Discusión	154
V.1- Respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con dengue. Asociaciones clínicas	155
V.1.1.- Citoquinas pro-inflamatorias	155
V.1.2.- Proteínas del complemento C3 y C4	158
V.1.3.- Proteínas C reactiva	160
V.1.4.- Oxido nítrico	161
V.2.- Efecto directo del DENV sobre la producción de citoquinas en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos	162
V.3.- Efecto directo del DENV sobre la producción de antioxidantes (CAT, SOD y GSH), radicales libres (NO) y productos de la peroxidación lipídica (MDA) en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos	165
V.4.- Efecto inductor/modulador del DENV sobre la apoptosis de monocitos de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos y ancianos	168
VI.- Conclusiones	170
VII.- Bibliografía	173

ABREVIATURAS

ADA: Amplificación Dependiente de Anticuerpos

C3: Complemento 3

C4: Complemento 4

CAT: Catalasa

CMN: Células Mononucleares

CSF: Factor Estimulante de Colonias

DC: Dengue Clásico

DEN: Dengue

DENV: Virus Dengue

DH: Dengue Hemorrágico

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática

SOD: Superóxido Dismutasa

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral-alfa

FHD: Fiebre Hemorrágica por Dengue

GSH: Glutati6n Reducido

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

IP: Infecci6n Primaria

IS: Infecci6n Secundaria

IL: Interleuquina

IL-1 β : Interleuquina -1 beta

IL-6: Interleuquina -6

LPS: Lipopolisacárido Bacteriano

MDA: Malondialdehído

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad

Mo/M ϕ : Monocito/Macrófago

NO: Óxido Nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PI: Post-Infecci6n

PCR: Proteína C Reactiva

RLOx: Radicales Libres de Oxígeno

SCD: Síndrome de Choque por Dengue

SFB: Suero Fetal Bovino

UFP/ml: Unidades Formadoras de Placa por ml

DENV: Virus Dengue

SUMMARY

STUDY OF THE IMMUNE / INFLAMMATORY AND OXIDATIVE RESPONSE IN PATIENTS AND IN VITRO EXPERIMENTAL MODEL IN DENGUE VIRUS INFECTION

Dengue is an important arboviral disease in tropical countries caused by a flavivirus. Dengue virus infection induces several immune disorders in the host that could be involved in the pathogenesis of the disease. It's not has been well established the role of monocyte/macrophage in increased expression of inflammatory mediators found in dengue infections. The aim of this study was to evaluate inflammatory mediators of the immune response in patients with dengue infection and its clinical significance, emphasizing the severity of the disease, the type of infection and the infecting viral serotype. In addition, we evaluated the effect of dengue virus on the function and viability of monocytes experimentally infected with dengue virus and under stimulation with LPS, from umbilical cord blood of newborns and peripheral blood of young adults and the elderly. In this regard, we determined the concentration of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β), complement proteins (C3 and C4), C-reactive protein (CRP) and nitric oxide (NO) in 70 patients with dengue in the acute phase. These patients were classified according to the severity of the disease according to WHO criteria in DF and DHF, and type of infection in primary infection (PI) and secondary infection (SI). The control group consisted of healthy individuals. The levels of circulating cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) and CRP were determined by ELISA, C3 and C4 by nephelometry, NO by Griess method and MDA by thiobarbituric acid method. We used virus serotypes isolated from patients with dengue and reference strains, which were propagated in C6/36 HT mosquito cells, and counting in VERO cells by the Plaque forming unit technique. Tests conducted in vitro, cultures of monocytes were infected with virus reference strains and stimulated with LPS for 1 and 3 days post-infection (PI). We determined the cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β , NO and MDA, using the culture supernatants and catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in cell lysates. Apoptosis was determined by TUNEL. Our results show a significant increase in the concentrations of TNF- α ($p < 0.001$), IL-6 ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.001$) and NO ($p < 0.01$) in patients with DF and

DHF and consumption of the C3 complement protein ($p < 0.01$). These findings were consistent with an increased production of TNF- α ($p < 0.001$), IL-6 ($p < 0.01$) and NO ($p < 0.001$) at 1 and 3 post-infection days in cultured monocytes. The patients were infected with serotypes 2, 3 and 4 of DENV. TNF- α is related to the severity of the disease, but not with the infecting serotype. While IL-6, CRP and C3 were associated with both the severity of the disease, and DENV-4, DENV-2 and DENV-3 serotypes, respectively. There was a differential activation of antioxidant mechanisms according to the age and the infecting serotype, because the increased production in monocytes from adults to CAT and GSH, and the elderly in the case of SOD, while DENV-1 and 4 induced higher production was observed. In addition, the DENV induced an increased number of apoptotic cells to the 1st ($p < 0.0001$) and 3rd ($p < 0.0001$) days PI in cultured monocytes. These results show that increased production of inflammatory mediators, oxidation and apoptosis in dengue, may be in part mediated by virus-monocyte interactions.

Keywords: *Dengue, cytokines, monocytes, oxidative stress, apoptosis.*

I. INTRODUCCIÓN

I.1.- Agente Etiológico.

El virus dengue (DENV) es un arbovirus que pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, un grupo de más de 68 agentes virales agrupados por su relación serológica y por la determinación de secuencias genómicas, donde al menos 30 de estos causan enfermedad en los humanos (Calisher *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1993). El DENV está representado por 4 serotipos (o subespecies): DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4; los cuales exhiben características antigénicas y serológicas diferentes, y además pueden presentar variantes genéticas (genotipos y topotipos) dentro de un mismo serotipo relacionadas con la virulencia y la procedencia geográfica de la cepa. Se ha descrito una homología de secuencia de aproximadamente 70% entre los diferentes serotipos de dengue, siendo dicha homología mayor entre los serotipos 1, 2, y 3 (Monath *et al.*, 1997). Los cuatro serotipos del DENV tienen una distribución geográfica cosmopolita y pueden causar un cuadro similar de condiciones clínicas (Gubler D, 1998).

En general, los flavivirus poseen una estructura uniforme, la envoltura del virión es ligeramente esférica, la nucleocápside es icosaédrica y contiene al virión. La superficie viral es inusualmente lisa y la membrana está completamente cubierta por la proteína E. El virión es infeccioso y está compuesto por 6% de ARN, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos. El genoma del virus está compuesto por una sola molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla lineal, de sentido positivo, posee aproximadamente 10,7 kb de longitud, de alta variabilidad genómica, y codifica para una poliproteína, que posteriormente es

procesada por enzimas tanto del virus como del hospedador, dando lugar a tres proteínas estructurales: la proteína E de envoltura, glicoproteína que cumple un papel importante durante la penetración del virus en la célula y en la respuesta inmunitaria, 12 prM de membrana y la proteína C de cápside; y a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5), siendo la proteína no estructural NS1 la que participa en la maduración viral (Mackenzie *et al.*, 1966).

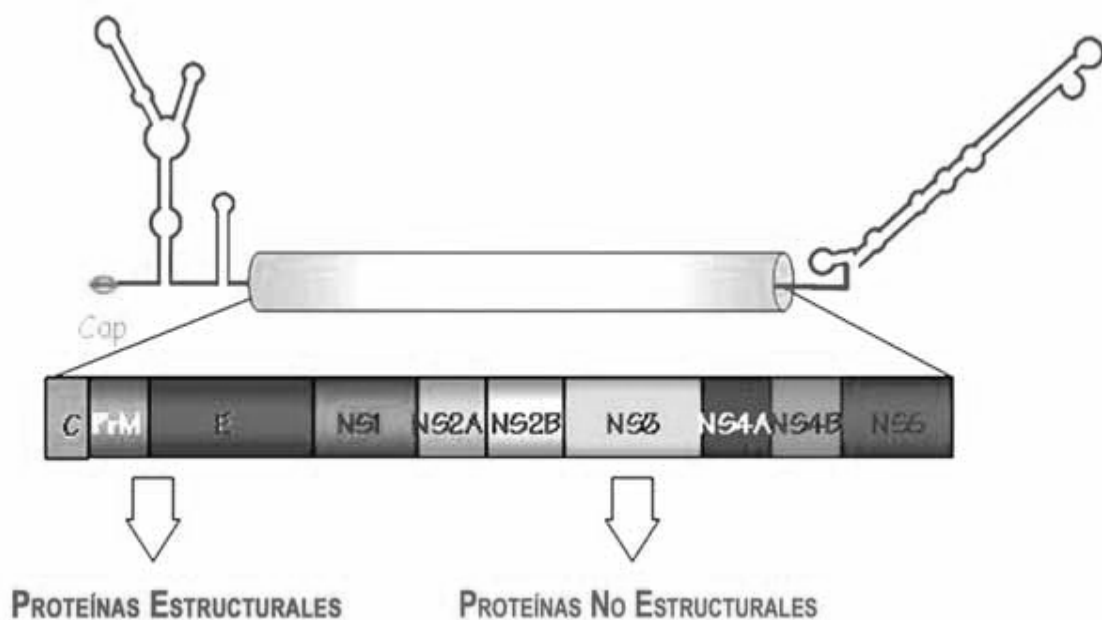


Figura 1. Esquema del genoma del virus dengue

Fuente: <http://www.mex.ops-oms.org/documentos/dengue/entrada.pdf>

La partícula viral del DENV es de forma esférica y mide entre 40 y 60 nm de diámetro. El material genético se encuentra protegido por una nucleocápside circular de simetría poliédrica, el diámetro del núcleo es de 25-30 nm. Entre la envoltura y la nucleocápside se encuentra una bicapa lipídica cuyos lípidos se derivan de la membrana celular del huésped (Monath *et al.*, 1997; Rico-Hesse, 1990).

El ciclo replicativo está marcado por la traslación del ARN genómico del virus al citoplasma celular del huésped, síntesis de cadenas negativas y positivas de ARN, y ensamblaje con liberación de partículas virales maduras (**Chambers *et al.*, 1990**).

Pudiera pensarse que la diversidad genética de este virus puede inducir a la aparición de cepas que se replican más rápidamente o son más patógenas (**Hoyos *et al.*, 2010**).

I.2.- Epidemiología.

El dengue es la enfermedad viral que causa más morbilidad y mortalidad que cualquier otra infección por arbovirus. En los últimos 50 años, la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado 30 veces con el aumento de la expansión geográfica a nuevos países. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que ocurren 50 millones de casos de nuevas infecciones por dengue en el mundo cada año, donde más de 60.000 niños han muerto debido al dengue hemorrágico. La prevalencia global del dengue ha crecido dramáticamente en décadas recientes. La enfermedad es ahora endémica en más de 100 países en África, América, el noroeste mediterráneo, sureste de Asia y el noroeste del Pacífico, amenazando a más de 2,5 billones de personas (**OMS, 2009; Gibbons *et al.*, 2002; Gubler, 1998**).

En América, el dengue adquiere cada vez mayor importancia como enfermedad re-emergente debido a la co-circulación de serotipos del virus, al incremento en el número de casos y consecuentemente a la expansión de áreas

epidémicas y a la aparición de casos de dengue hemorrágico/síndrome de choque por dengue (DH/SCD). Esta enfermedad transmitida por mosquitos, afecta las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, predominantemente en áreas urbanas y semi-urbanas, dada la especial ecología de su vector principal, *Aedes aegypti* (Shu *et al.*, 2004).

I.2.1.- El vector: *Aedes aegypti*.

El *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) es el principal vector del dengue. Este género está extensamente distribuido dentro de los límites de las latitudes 40°N y 40°S y es altamente susceptible a temperaturas extremas y climas cálidos secos. Los adultos pierden actividad por desecación o por debajo de 12-14 °C. El *A. aegypti* ahora es doméstico, inicialmente tenía su hábitat en la selva, pero al transcurrir del tiempo se ha convertido en un insecto urbano que prefiere vivir dentro de las casas (Hoyos *et al.*, 2010).

Los virus se mantienen en un ciclo *A. aegypti* – humano - *A. aegypti* con epidemias periódicas. Los humanos se infectan con el virus dengue a través de la picadura del mosquito infectante, el cual es un mosquito tropical pequeño, de color blanco y negro, altamente domesticado (Hoyos *et al.*, 2010).

El mosquito generalmente presenta dos picos de actividad, pica en las primeras horas de la mañana, de 2 a 3 horas después del desayuno, y con mayor frecuencia al atardecer, varias horas antes de oscurecer (**Morbidity and Mortality Weekly**

Report, 1995; Lanciotti et al., 1994). El mosquito hembra es el que pica al hombre y lo puede realizar múltiples veces, por lo que un solo mosquito puede causar múltiples infecciones. Para transmitir la enfermedad es necesario que el mosquito haya picado a una persona con dengue en los primeros 3 - 5 días de la enfermedad. Durante esta etapa el virus está circulando en la sangre y puede ser transmitido al vector. Una vez que una persona haya sido picada por un mosquito infectante, el virus experimenta un periodo de incubación de 3 a 14 días (promedio de 5 a 7 días), luego del cual la persona puede experimentar inicio agudo de fiebre, acompañada de una variedad de signos y síntomas inespecíficos. Durante el periodo febril agudo, el cual puede ser tan corto como 2 días, o tan largo como 10 días, el virus puede circular en sangre periférica. Si otro mosquito *A. aegypti* pica a la persona enferma durante este estadio febril virémico, los mosquitos pueden llegar a infectarse, y subsecuentemente transmitir el virus a otra persona sana, después de un periodo de incubación extrínseco de 8 a 12 días. Estos pueden transmitir la enfermedad por el resto de su vida, que es de un promedio de 65 días (**Chungue et al., 1993**).

I.2.1.1.- Ciclo Biológico del *Aedes aegypti*.

En relación al ciclo biológico del vector, cada hembra puede ovopositar de 100 - 200 huevos por postura, pudiendo resistir las sequías hasta un año. El huevo mide aproximadamente 1 mm, es ovalado, blanco y luego se torna a negro al desarrollar el embrión. Es depositado individualmente en diferentes recipientes por encima del nivel del agua. El ciclo desde la postura a la eclosión en condiciones óptimas de humedad y temperatura dura 48 horas, pero puede prolongarse hasta 5 días. Entre 7

y 10 días los huevos se convierten en larvas. La larva tiene tres fases: acuática, de alimentación y de crecimiento. El mosquito se divide en cabeza, tórax y nueve segmentos abdominales; el segmento posterior y anal tienen cuatro branquias lobuladas; un sifón respiratorio corto por el cual respira y se mantiene en la superficie casi vertical. Poseen cuatro espinas torácicas, dos a cada lado. El octavo segmento con una hilera de siete a doce dientes formando el peine y sifón con el pecten. Tiene un movimiento serpenteante y presentan gran fotofobia. La fase completa demora entre ocho y doce días. Posteriormente, se forma la pupa, en esta fase no se alimenta y su función es la metamorfosis de larva a adulto. Se mueve rápidamente ante un estímulo y cuando están inactivas flotan en la superficie. Presentan una trompeta respiratoria corta y con un solo pelo en el borde de la paleta natatoria, en la base del abdomen tiene un par de aletas o remos que le sirven para nadar. Este estadio dura de dos a tres días, para dar paso a la formación del mosquito adulto, el cual representa la fase reproductora del *A. aegypti*. Las hembras se distinguen de los anofelinos por tener palpos más cortos y por adoptar una posición horizontal durante el reposo. Se caracteriza por tener un abdomen agudo, de color negro con manchas blancas y plateadas en diferentes partes del cuerpo. En el tórax (mesonoto) tiene un dibujo característico con franjas claras a manera de "lira" (Balta R, 1997).

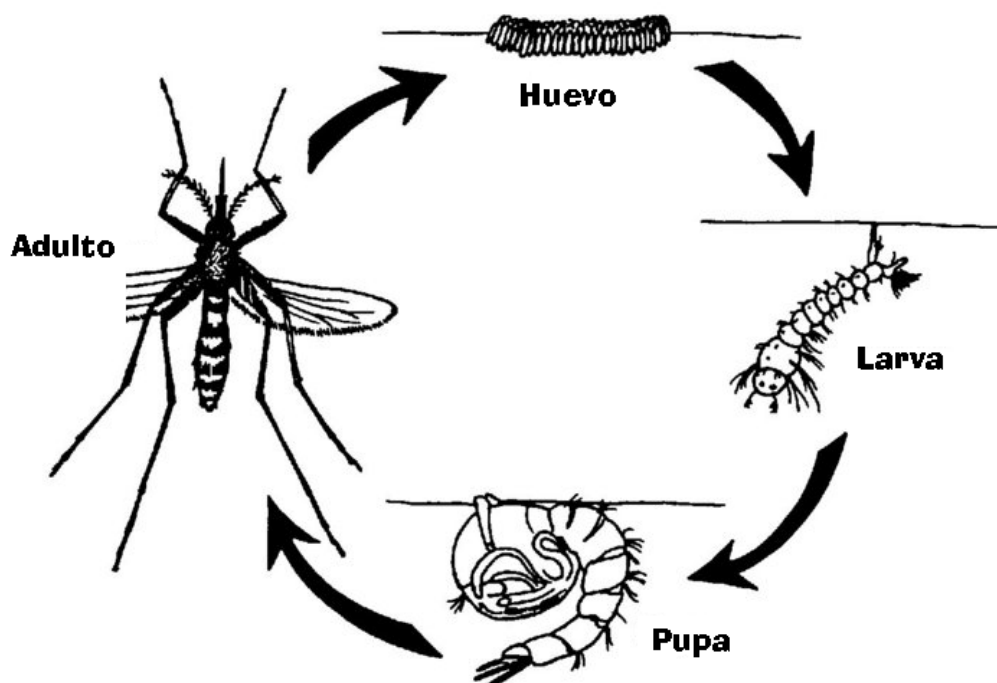


Figura 2. Ciclo Biológico del *Aedes aegypti*.
Fuente: <http://i29.tinypic.com/2s9qblk.jpg>

I.2.1.2.- Ecología del mosquito adulto.

La ecología del adulto comprende varias fases: 1) Emergencia: Luego de emerger de la pupa, el insecto se posa sobre las paredes del recipiente durante varias horas hasta el endurecimiento de sus alas y su exoesqueleto. 2) Apareamiento: Dentro de las 24 horas, después de la emergencia, puede ocurrir el apareamiento. El macho es atraído por el sonido emitido por el batir de las alas de la hembra durante el vuelo. 3) Alimentación: Las hembras se alimentan de la mayoría de vertebrados, pero prefieren a los humanos, vuelan en sentido contrario al viento y son atraídas por los olores y gases del hombre. La sangre sirve para el desarrollo de los huevos. 4) Ciclo gonadotrófico: Después de cada alimentación se desarrolla un

lote de huevos. Si la hembra completa su alimentación sanguínea (2-3 mg) desarrollará y pondrá 100 - 200 huevos, el intervalo dura de dos a tres días. La hembra grávida buscará recipientes oscuros o sombreados para depositar sus huevos, prefiriendo aguas limpias y claras. 5) Rango de vuelo: La hembra no sobrepasa los 50 - 100 metros durante su vida (puede permanecer en la misma casa donde emergió). Si no hay recipientes, una hembra grávida puede volar tres kilómetros para poner sus huevos. Los machos se dispersan menos que las hembras. Sin embargo, se describe un rango de vuelo de 200 a 300 metros. 6) Conducta de reposo: Descansan en lugares sombreados como alcobas, baños, patios o cocinas. Se les captura sobre ropas colgadas, debajo de muebles, toallas, cortinas y mosquiteros. 7) Longevidad: Los adultos pueden permanecer vivos en el laboratorio durante meses y en la naturaleza pocas semanas. Con una mortalidad diaria de 10%, la mitad de los mosquitos morirán durante la primera semana y 95% en el primer mes. 8) Período de Transmisibilidad: El tiempo intrínseco de transmisibilidad corresponde al de la viremia de la persona infectada. Comienza un día antes del inicio de la fiebre y se extiende hasta el 6to. u 8vo. día de la enfermedad (**Ramírez et al., 1994**). El virus se multiplica en el epitelio intestinal del mosquito hembra infectado, ganglios nerviosos, cuerpo graso y glándulas salivales. El mosquito permanece infectado y asintomático toda su vida, que puede ser de semanas o meses en condiciones de hibernación. Luego de 7 a 14 días "tiempo de incubación extrínseco" puede infectar al hombre por nueva picadura (**OPS, 2000**).

I.2.2.- Ciclos de Transmisión del dengue.

En la infección por dengue, se han identificado tres ciclos de transmisión, el Selvático/Enzoótico, el Rural/Epidémico y el Urbano/Endémico/Epidémico. El ciclo enzoótico primitivo del DENV involucra mosquitos *Aedes*, vivienda-bosque y primates inferiores en los bosques tropicales de Asia y África. Actualmente, las evidencias sugieren que estos virus no migran regularmente de los bosques a áreas urbanas. Puede ocurrir un ciclo de transmisión epidémica en áreas rurales o islas, donde la población humana es pequeña. Un gran número de *Aedes* (*Stegomyia*) spp. pueden actuar como vectores en estas situaciones, dependiendo del área geográfica, donde se encuentren, tales como: *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* y otros miembros del grupo *A. scutellaris*. El ciclo de transmisión más importante desde el punto de vista de salud pública es el Urbano/Endémico/Epidémico en áreas urbanas grandes de las zonas tropicales (Gubler, 1998).

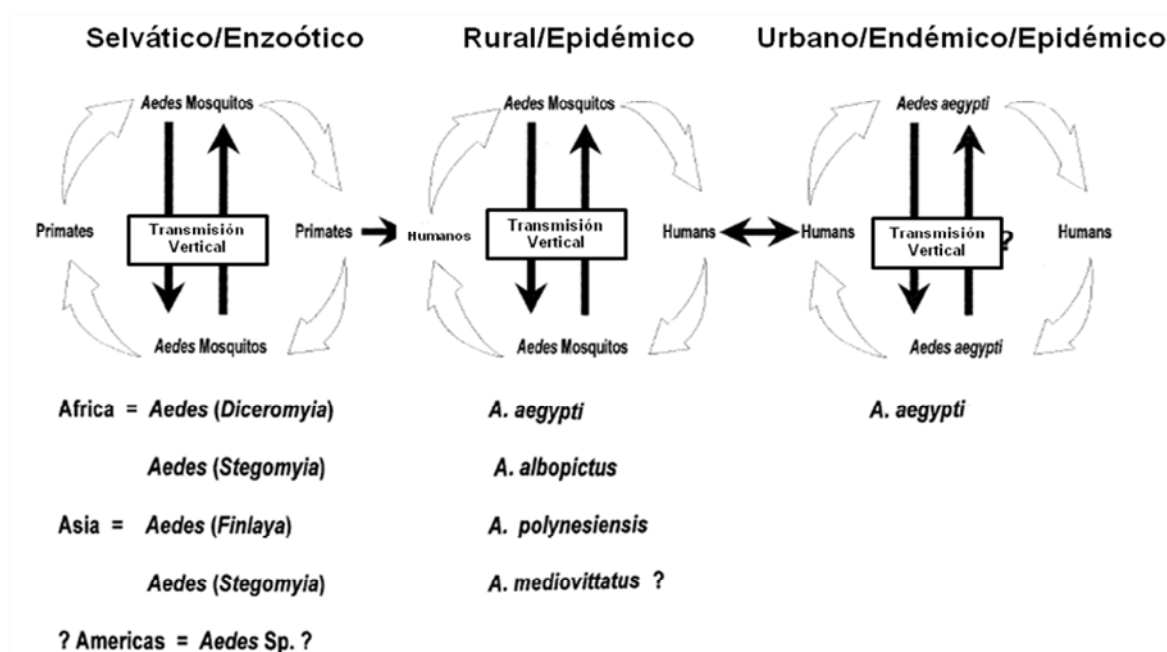


Figura 3. Ciclos de Transmisión del Dengue.

Fuente: Gubler, 1998

Otro vector de importancia epidemiológica es *Aedes albopictus*, de gran distribución en Brasil. Es el vector que mantiene la enfermedad en Asia y ha sido introducido en América difundiéndose en varios países. Ambos vectores están caracterizados actualmente en el subgénero *Stegomyia*. Recientemente en Venezuela se registró por primera vez esta especie, pudiendo existir la posibilidad de una rápida propagación desde un punto focal inicial o múltiples introducciones previas al establecimiento. Mientras que en otras zonas del mundo hay otras especies vectoras (OPS, 2000; Navarro *et al.*, 2009).

I.2.3.- Factores de Riesgo.

Entre los factores de riesgo del dengue, se describen la presencia simultánea del vector y el huésped, y las condiciones que favorecen la proliferación de los mosquitos transmisores. Las densidades del vector aumentan con las prácticas de almacenamiento de agua en los hogares debido a los problemas recurrentes de abastecimiento de la misma, así como el incremento del número de envases capaces de contener agua. Entre los factores que coadyuvan a la aparición y reaparición del dengue se pueden mencionar el rápido crecimiento y urbanización de las poblaciones en América Latina y el Caribe, y el incremento de la movilidad de las personas. Por ello, se destaca que las causas que contribuyen a la propagación del dengue son el crecimiento demográfico, la urbanización y las deficiencias del saneamiento ambiental (PAHO, 1994).

La descripción de los factores de riesgo se ha particularizado en macro determinantes de la transmisión (entre los que se cuenta el área geográfica, clima y altitud; densidad poblacional, urbanizaciones no planificadas y las altas densidades de viviendas; viviendas sin protección en sus vanos proclives a la penetración del vector, también la obstrucción de los tragantes de agua lluvia con cenizas y el agua almacenada por más de una semana en recipientes sin tapas; los sistemas inapropiados de manejo y disposición de basura y la presencia de chatarra, neumáticos abandonados y pequeños recipientes) y micro determinantes (como la característica de los huéspedes: sexo, edad, estado inmunitario, condiciones de salud, ocupación; los factores del agente: el nivel de viremia; los factores del vector: la densidad de mosquitos hembras adultos, edad, frecuencia de alimentación, preferencia y disponibilidad de huéspedes, y susceptibilidad innata a la infección) (OPS, 1996).

I.3.- Manifestaciones Clínicas del Dengue.

El dengue es una enfermedad viral, febril y aguda que afecta a humanos. Presenta un amplio cuadro de condiciones clínicas, a menudo con evolución y resolución clínica impredecible. Mientras la mayoría de los pacientes se recuperan siguiendo un curso clínico no severo y autolimitado, una pequeña proporción progresa a enfermedad grave, principalmente caracterizada por pérdida de plasma con o sin hemorragia. Anteriormente no estaban bien establecidos los criterios para definir las formas clínicas de la enfermedad, lo cual dificultaba la aplicación de un

tratamiento apropiado que pudiese prevenir que estos pacientes desarrollen condiciones más severas (OMS, 2009).

Los cambios en la epidemiología del dengue, conllevaron a problemas con el uso de la clasificación existente de la OMS, donde las infecciones sintomáticas por DENV fueron agrupadas en tres categorías: fiebre indiferenciada, dengue clásico (DC) y dengue hemorrágico (DH). El DC, caracterizado por manifestaciones sistémicas leves como fiebre, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, mialgias y erupción; el DH, que se acompaña de trombocitopenia, hemorragia, activación masiva del complemento y extravasación de plasma a los espacios intersticiales causando hipovolemia, lo que puede llevar a colapso circulatorio que conduzca a choque, escenario conocido como Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (Salas *et al.*, 1998; WHO, 1997).

La severidad del DH se graduó de acuerdo a los criterios de la OMS (1997) en grado I: fiebre acompañada por síntomas generales no específicos, y la única manifestación hemorrágica es una prueba de torniquete positiva, grado II: la misma sintomatología del grado I más sangrado espontáneo de cualquier localización; grado III: insuficiencia circulatoria que se manifiesta por pulso rápido y débil, tensión diferencial disminuida (20 mmHg o menos) o hipotensión arterial; con piel fría y húmeda, y agitación; y el grado IV: choque profundo con presión arterial y pulso imperceptible. El DH y el SCD se definieron por un rango de manifestaciones clínico

– patológicas. La presencia de trombocitopenia con hemoconcentración simultánea diferencia el dengue simple de los grados I y II del DH.

Sin embargo, existen reportes sobre las dificultades en la aplicación de la clasificación del DH en la situación clínica (**Bandyopadhyay et al., 2006**), todo esto aunado al incremento en los casos de dengue severo, los cuales no cumplieron estrictamente el criterio de DH, lo que conllevó a que la clasificación se reconsiderara, aunque actualmente la clasificación en DC/DH/SCD continúa siendo ampliamente utilizada (**OMS, 2009**).

Por ello, la OMS/TDR (Programme for Research and Training in Tropical Diseases) en un estudio prospectivo multicéntrico en regiones endémicas para dengue, recolectaron evidencias sobre los criterios para la clasificación de la enfermedad en niveles de severidad. El estudio reveló que usando un conjunto de parámetros clínicos y de laboratorio, se observa claramente diferencias entre los pacientes con dengue severo de aquellos con cuadro no severo. Sin embargo, las razones prácticas conllevaron a dividir un gran grupo de pacientes con dengue no severo en 2 sub-grupos: pacientes con signos de alarma y sin ellos. Teniendo presente que incluso los pacientes con dengue sin signos de alarma, pueden llegar a desarrollar la forma severa.

Por lo tanto, según los criterios sugeridos por la OMS (2009) los casos de dengue y los niveles de severidad se clasifican en:

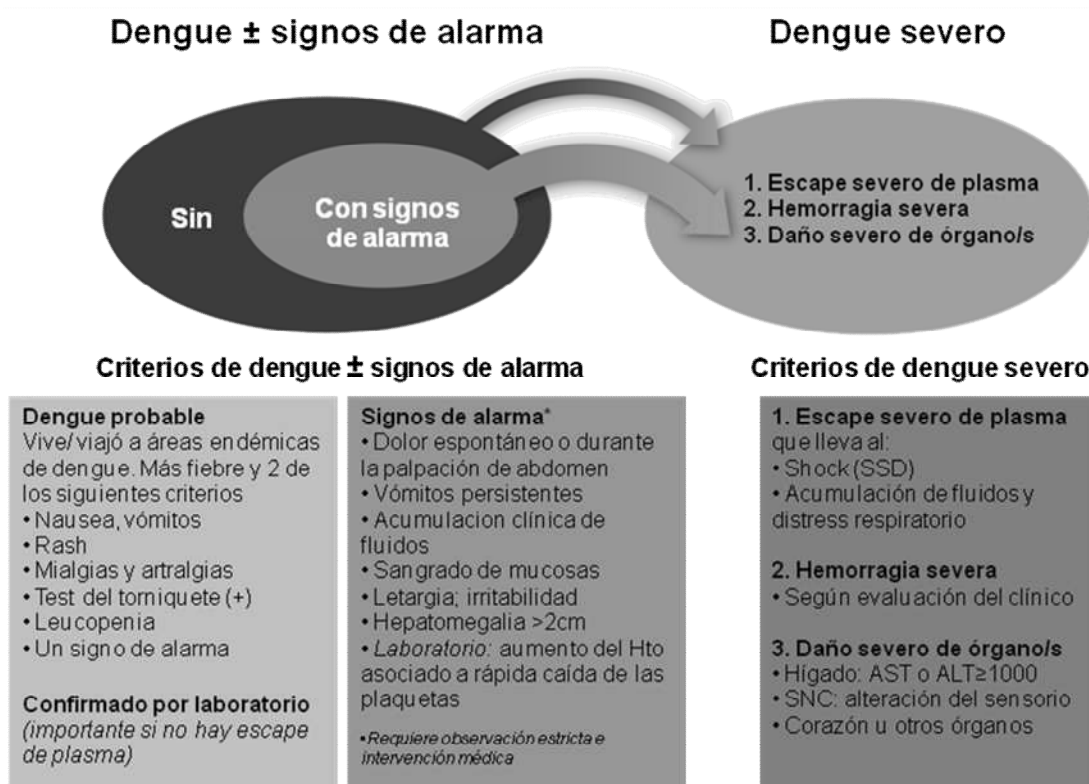


Figura 4. Clasificación de dengue.

Fuente: OMS, 2009

El periodo de incubación de la infección por virus dengue varía de 3 a 14 días (promedio, 4 a 7 días). La viremia generalmente dura de 4 a 5 días para luego desaparecer rápidamente y dar lugar a la aparición de anticuerpos específicos y células T específicas contra antígenos del virus. Los anticuerpos Inmunoglobulina M (IgM) específicos para el virus dengue llegan a ser positivos aproximadamente en el sexto día del inicio de la enfermedad en la mayoría de los pacientes. Durante la infección primaria por el virus dengue, los anticuerpos IgG aparecen unos pocos días después de la IgM a títulos bajos (<1:20). En la infección secundaria, ocurre una

respuesta anamnésica, causando títulos que aumentan rápidamente, casi inmediatamente seguido del inicio de la enfermedad, y luego permanecen altos en la mayoría de los pacientes (Vaughn *et al.*, 1997; Vorndam *et al.*, 1997).

I.3.1.- Fases de la Enfermedad.

Después del periodo de incubación, la enfermedad inicia abruptamente seguida de tres fases: febril, crítica y convalecencia. En la fase febril, los pacientes desarrollan fiebre alta repentina. Esta fase usualmente dura de 2 a 7 días y a menudo se acompaña de rubor facial, eritema en piel, dolor corporal generalizado, mialgia, artralgia y cefalea. Algunos pacientes pueden presentar dolor de garganta, faringitis y conjuntivitis. La anorexia, náuseas y vómitos son muy comunes. Dado que resulta difícil distinguir el dengue con una enfermedad febril no-dengue en la fase febril temprana, la prueba de torniquete positiva aumenta la probabilidad confirmar la enfermedad (WHO, 2005 y 2008). Por lo tanto, el monitoreo de los signos de alarma y otros parámetros clínicos resultan cruciales para reconocer el progreso hacia la fase crítica. Además, se pueden observar manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado en mucosas (por ejemplo: nariz y encías). El sangrado vaginal masivo (en mujeres en edad reproductiva) y hemorragia gastrointestinal pueden ocurrir durante esta fase, pero es poco común. Se evidencia hepatomegalia después de pocos días de fiebre. La anormalidad más temprana en el conteo hematológico es una disminución progresiva de la cuenta blanca total, la cual debería ser una señal de alerta para reconocer una alta probabilidad de presentar la enfermedad (WHO, 2004 y 2005).

Al momento de la defervescencia, cuando la temperatura se encuentra a 37,5 - 38°C o menos y permanece bajo este nivel, generalmente en los días 3 y 7 de la enfermedad, puede ocurrir un aumento en la permeabilidad vascular paralelo con un incremento en los valores de hematocrito (WHO, 2008; PAHO, 1997). Este es el indicador para el comienzo de la fase crítica. El periodo de pérdida plasmática con significancia clínica generalmente tarda de 24 a 48 horas. La leucopenia progresiva seguida de una rápida disminución en el conteo plaquetario generalmente precede a la pérdida de plasma. En este momento, si no existe aumento en la permeabilidad vascular, los pacientes pueden mejorar, mientras que aquellos con aumento de la misma llegan a empeorar como resultado de la pérdida del volumen plasmático. El grado de pérdida plasmática puede variar. La efusión pleural y la ascitis pueden ser clínicamente detectables dependiendo del grado de pérdida de plasma y del volumen de la terapia de fluido. Por lo tanto, la radiografía de tórax y el ultrasonido abdominal pueden ser herramientas útiles para el diagnóstico. El aumento del hematocrito sobre los valores de referencia refleja la severidad de pérdida plasmática. El choque ocurre cuando se pierde un volumen crítico de plasma, que se predice por los signos de alarma. La temperatura corporal se puede alterar cuando ocurre el choque. Con un choque prolongado, la consiguiente hipoperfusión del órgano da lugar al deterioro progresivo del órgano, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada (CID). Esto conlleva a la hemorragia severa que hace que el hematocrito disminuya en el choque severo. De hecho, la leucopenia generalmente se observa en esta fase, pero la cuenta blanca total puede aumentar en pacientes con sangrado severo (PAHO, 2008).

Los pacientes que mejoran después de la defervescencia se clasifican como dengue no severo. Algunos pacientes progresan a la fase crítica de pérdida de plasma sin defervescencia y, en estos pacientes, los cambios en el conteo hematológico total deberían ser usados para guiar el inicio de la fase crítica y pérdida plasmática. Aquellos que empeoran y manifiestan signos de alarma se les clasifican como dengue con signos de alarma.

En la fase de convalecencia, si el paciente resiste las 24 a 48 horas de la fase crítica, en las siguientes 48-72 horas ocurre una reabsorción gradual del fluido del compartimiento extravascular, el bienestar general mejora, retorna el apetito, los síntomas gastrointestinales disminuyen, el estado hemodinámico se estabiliza y la diuresis regresa. Algunos pacientes pueden presentar erupción en forma de “islas de blanco en un mar rojo”. Algunos pueden experimentar prurito generalizado. La bradicardia y los cambios electrocardiográficos son comunes durante esta etapa. El hematocrito se estabiliza o puede ser más bajo debido a la dilución del fluido reabsorbido. La cuenta blanca comienza generalmente a incrementarse pronto después de la defervescencia, pero la recuperación del conteo plaquetario ocurre después que el de la cuenta blanca. La dificultad respiratoria por la efusión pleural masiva y la ascitis ocurren en cualquier momento si se han administrado líquidos intravenosos excesivos. Durante las fases críticas y/o de convalecencia, la terapia de fluido excesiva se asocia con edema pulmonar o paro cardíaco congestivo (CDC, 2006).

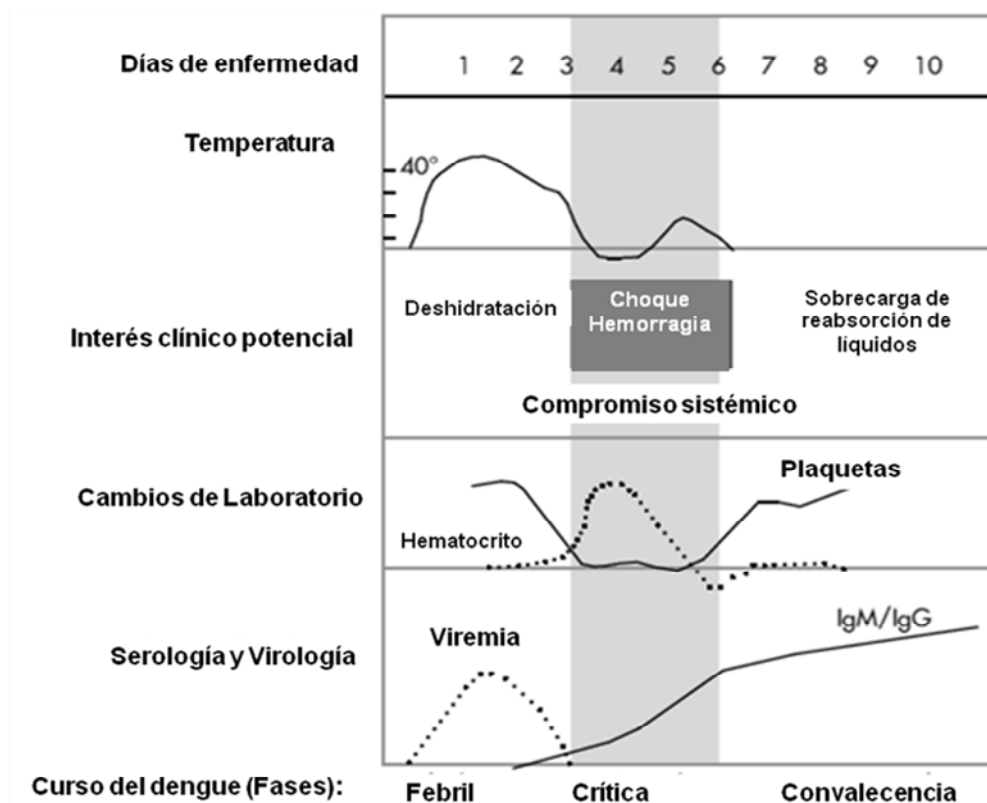


Figura 5. Evolución clínica de la enfermedad
Fuente: OMS, 2009.

Por su parte, el dengue severo se define por uno o más de los siguientes signos: (i) pérdida de plasma que puede conllevar a choque (choque por dengue) y/o acumulación de líquido, con o sin dificultad respiratoria, y/o (ii) sangrado severo, y/o (iii) compromiso severo de órganos.

Debido a que la permeabilidad vascular progresa, la hipovolemia empeora y causa choque. Esto ocurre generalmente alrededor de defervescencia, en el día 4 o 5 (promedio 3-7 días) de la enfermedad, precedidos por los signos de alarma. Durante la etapa inicial del choque, el mecanismo compensatorio que mantiene una presión arterial sistólica normal también produce taquicardia y vasoconstricción

periférica con la perfusión de la piel reducida, produciendo extremidades frías. Sólo la presión arterial diastólica se eleva hacia la presión arterial sistólica y el pulso disminuye a medida que aumenta la resistencia vascular periférica. Los pacientes con SCD permanecen conscientes. El médico inexperto puede medir una presión sistólica normal y juzgar mal el estado crítico del paciente. Finalmente, hay descompensación y ambas presiones desaparecen rápidamente. El choque hipotensivo prolongado y la hipoxia pueden conducir a la falla de múltiples órganos y un curso clínico extremadamente difícil. Un paciente se considera que está en choque si el pulso (la diferencia entre la presión sistólica y diastólica) es ≤ 20 mmHg en niños o si presenta signos de perfusión vascular pobre (extremidades frías, relleno capilar retrasado, o pulso rápido). En los adultos, el pulso ≤ 20 mmHg puede indicar un choque más severo. La hipotensión se asocia generalmente con choque prolongado que a menudo se complica con sangrado importante.

Los pacientes con dengue severo pueden tener anormalidades de la coagulación, pero éstas no son suficientes para causar una hemorragia importante. Cuando ocurre un sangrado, casi siempre se asocia a choque profundo dado que, la combinación trombocitopenia, hipoxia y acidosis, conllevan al deterioro de múltiples órganos y a una avanzada CID. Puede ocurrir un sangrado excesivo sin choque prolongado en los casos donde se haya suministrado medicamentos como ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno o corticoesteroides.

Las manifestaciones inusuales, incluyen disfunción aguda del hígado y encefalopatía, que pueden estar presentes incluso en ausencia de pérdida plasmática severa o de choque. La cardiomiopatía y la encefalitis también se han reportado en algunos casos de dengue. Sin embargo, la mayoría de las muertes por dengue ocurre en pacientes con choque profundo, particularmente si la situación es complicada por sobrecarga de líquido.

El dengue severo debe ser considerado si el paciente habita en un área de alto riesgo presentando fiebre de 2 a 7 días más con algunas de las siguientes características: evidencia de pérdida de plasma, tales como hematocrito alto o elevación progresiva, efusión pleural o ascitis, compromiso circulatorio o choque (taquicardia, extremidades frías y húmedas, tiempo de reflujo capilar mayor a tres segundos, pulso débil o imperceptible, presión sanguínea disminuida, y en caso de choque, presión arterial no registrada), sangrado, alteración del estado de conciencia (somnolencia o irritabilidad, coma, convulsiones), compromiso gastrointestinal severo (vómito persistente, dolor abdominal intenso, ictericia), y compromiso severo de órganos (falla hepática aguda, falla renal aguda, encefalopatía o encefalitis, u otras manifestaciones inusuales como cardiomiopatía) (OMS, 2009).

I.4.- Prevención y control.

La prevención y el control del dengue llegan a ser sumamente urgentes con la expansión de la distribución geográfica y el incremento de la incidencia de la enfermedad en las últimas décadas (Gubler, 1997; Monath, 1994; Halstead, 1992).

Desafortunadamente, las herramientas para prevenir la infección son muy limitadas. Actualmente, no se cuenta con una vacuna disponible y las opciones para el control del mosquito son limitadas. Los programas efectivos de prevención de la enfermedad deberían contar con varios componentes integrados, tales como vigilancia serológica, respuesta de emergencia, educación a la comunidad médica para asegurar el manejo efectivo de los casos, control del mosquito por parte de las comunidades y el uso de una vacuna efectiva cuando esté disponible (Gubler, 1991 y 1988).

Las medidas preventivas deben ir dirigidas principalmente al control del mosquito vector. El fracaso en el control de *A. aegypti* mediante las medidas tradicionales de combate químico ha llevado a buscar alternativas de control integrado en el marco de la atención primaria y la participación comunitaria. Una de esas estrategias ha sido el desarrollo de cursos especiales sobre dengue y *A. aegypti*, dirigidos a escolares y encaminados a promover en los jefes de familia cambios de comportamiento que lleven a la eliminación y al control de criaderos (Madeira *et al.*, 2002; Winch *et al.*, 1990).

Sin embargo, recientes investigaciones en biología molecular y biotecnología han proporcionado nuevos avances de alta tecnología para el diseño de la vacuna contra el dengue. Otras vacunas como fiebre amarilla, encefalitis japonesa y encefalitis transmitidas por garrapatas se encuentran disponibles comercialmente hasta el momento, y aunque proporcionan una guía clara para el desarrollo de una

vacuna exitosa para esta enfermedad, se requieren nuevas mejoras en términos de seguridad, eficacia, costo y admisión regulada (**Konstantin et al., 2003**).

Los esfuerzos para desarrollar una vacuna contra el dengue comenzaron durante la segunda guerra mundial, inspirados en el desarrollo exitoso de una vacuna contra la fiebre amarilla, pero, la falta de modelos adecuados de la enfermedad y la información incompleta acerca de los mecanismos patogénicos han dificultado los avances a este respecto. No obstante, el impacto actual del dengue en todo el mundo y su gran diseminación, ha aumentado el interés en el desarrollo de vacunas para este agente infeccioso y se ha avanzado considerablemente en el camino hacia la evaluación clínica de vacunas candidatas (**Hombach, 2007**). Aunque existen varias vacunas candidatas contra el dengue, aún no se cuenta con una vacuna ideal que sea capaz de proteger a la población en riesgo, libre de reactogenicidad, que induzca protección contra los cuatro serotipos del virus (tetravalente), que ofrezca efectiva protección prolongada, que sea altamente inmunogénica con pocos efectos adversos, de fácil administración, que esté disponible a bajos costos y se administre en una monodosis, tanto en adultos como en niños (**Valero y Levy, 2008**).

Los requerimientos para que se desarrolle una sola vacuna que induzca inmunidad protectora contra los cuatro serotipos del virus, que excluya la aparición del fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), DH y SCD y que proporcionen inmunidad a largo plazo, son los principales retos para el

desarrollo de esta vacuna. Inicialmente, se consideraba altamente factible una vacuna para el dengue, debido a que la replicación del virus es controlada después de un corto periodo de viremia (3 a 7 días) y que los individuos recuperados se encuentran inmunizados a exposiciones futuras con serotipos homólogos. En este sentido, se han realizado numerosos intentos en tratar de producir una vacuna que cumpla con los requerimientos deseados. Diversas vacunas multivalentes de dengue se encuentran en varios estadios de desarrollo, pero todavía ninguna está cerca de obtener la licencia. Entre los candidatos a vacunas para dengue que se encuentran actualmente en etapas avanzadas de desarrollo, están fundamentalmente: vivas atenuadas, vivas atenuadas quiméricas, virus inactivados, de subunidades y de ADN, todas enfocadas con el objetivo de mimetizar la infección natural (**Halstead and Deen, 2002**).

Los principios para el desarrollo de esta vacuna se enfocan principalmente en los candidatos de vacuna viva atenuada, debido a que en primer lugar, pueden inducir una respuesta celular y humoral duradera, mimetizando la infección natural por el virus dengue, tanto para proteínas estructurales como de no estructurales; mientras que con las vacunas derivadas de virus quiméricos antigénicos atenuados se induce una respuesta más restringida a las proteínas NS dependiendo del antecedente genético del individuo. Por otro lado, la replicación de una vacuna de dengue vivo necesita estar suficientemente restringida para poder evitar el desarrollo de la enfermedad. Es necesario que la replicación de candidatos a vacuna produzca signos sub-clínicos y asintomáticos de infección para inducir una respuesta

inmunitaria protectora. Además, los mosquitos deberían reducir la transmisibilidad del virus, los cuales pueden ser controlados a través de títulos bajos de viremia. La cepa vacunal debería tener alta infectividad en humanos para que sea infecciosa a bajas dosis, que se replique eficazmente en cultivos de tejidos y pueda ser producida a bajo costo. Cada uno de los cuatro componentes de la vacuna debería replicarse suficientemente en humanos para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes balanceada para cada uno de los cuatro serotipos. Por último, es mejor si las bases genéticas de atenuación para cada uno de los cuatro componentes está claramente definida, a fin de que la estabilidad genética pueda ser controlada durante todas las fases de fabricación y utilización en seres humanos (Valero y Levy, 2008; Whitehead *et al.*, 2007).

Las vacunas de virus inactivados cuentan con mayor seguridad con respecto a la de virus vivos atenuados, dado que el virus no puede mutar y adquirir un fenotipo más patógeno. Además, la inducción de una respuesta de anticuerpos balanceada en una vacuna de virus inactivada multivalente debería ser igualmente inmunogénica para cada uno de los cuatro serotipos. Sin embargo, esta vacuna solo contiene proteínas estructurales del virus, lo cual falla en inducir cualquier inmunidad para las proteínas NS, se requiere de adyuvantes para una inmunogenicidad óptima, y el grado de reactogenicidad y alto costo de la vacuna, la hace el candidato menos atractivo para su uso en áreas endémicas de dengue. Las vacunas en base a subunidades recombinantes y de ácidos nucleicos, aún no han mostrado resultados apreciables dado que la de subunidades puede desencadenar niveles de anticuerpos

de moderados a altos y puede que muestre alguna o todas las dificultades de la vacuna de virus inactivado. Las de ADN requiere aplicación en múltiples dosis, el uso de adyuvantes experimentales y equipos de inyección especializados (Whitehead *et al.*, 2007). Todo esto favorece a la vacuna de virus atenuadas quimérica para ser el candidato más aceptado, donde se pretende crear una vacuna quimérica sustituyendo los genes para las proteínas prM y E de cada uno de los cuatro serotipos del virus en la cepa de la vacuna YF17D atenuada viva, debido a que con esta primera vacuna que se encuentra disponible en el mercado (Fiebre Amarilla) se han observado resultados favorables (Guirakhoo *et al.*, 2001).

Mientras tanto los esfuerzos por tratar de otorgar inmunoprofilaxis para esta enfermedad continúan, por lo que científicos y diseñadores de vacunas relacionados a este virus deben unir sus esfuerzos para lograr una vacuna que cumpla con los requisitos y sea ideal, que permita erradicar la enfermedad y a su vez disminuya el número de casos en nuestras poblaciones que cada día se ven más afectadas por esta enfermedad.

I.5.- Patogénesis del dengue.

I.5.1.- Factores Virales.

La capacidad de un virus para producir enfermedad en un huésped, es una hipótesis alternativa para la patogénesis del DH/SCD. Las diferentes manifestaciones del dengue pueden ser causadas por variantes del virus con diferentes grados de virulencia. El riesgo de DH/SCD es mayor en infecciones secundarias con el serotipo

2 del virus dengue comparado con los otros serotipos (Rico-Hesse *et al.*, 1997 y 1998). Se han encontrado diferencias estructurales en varios aislados de pacientes con DC y DH (Leitmeyer *et al.*, 1999). También, se ha reportado que altos títulos de viremia por dengue están asociados con el incremento de la severidad de la enfermedad (Vaughn *et al.*, 1997 y 2000). La carga viral es un factor contribuyente de DH/SCD. Lei *et al.*, 2008, en estudio realizado en niños tailandeses encontraron que los picos de los títulos virales eran de 10 a 100 veces más altos en pacientes con SCD que en aquellos con DC. Pero, esto tiene cambios dinámicos, variando de individuo a individuo, o aún de día a día después de la infección, y disminuye rápidamente el día que desaparece la fiebre. La carga viral es el reflejo de la virulencia; la alta tasa de crecimiento *in vivo* o la consecuencia de la respuesta inmunitaria del huésped requieren investigaciones diferenciales posteriores. Sin embargo, las personas infectadas con el mismo serotipo del virus dengue, tendrán manifestaciones clínicas diferentes, sugiriendo que los factores del huésped juegan un papel importantes en el desarrollo de esta enfermedad.

Los primates y huéspedes naturales han sido estudiados para evaluar la patogénesis del dengue, pero éstos generalmente no muestran signos de la enfermedad. Estos animales se infectan y llegan a desarrollar la viremia, aunque a títulos más bajos que los humanos, por lo que los resultados obtenidos en estos modelos han resultado dificultosos (Gubler, 1998). Sin embargo, se ha descrito la presencia de un modelo animal adecuado para estudiar la patogénesis de la enfermedad, así como inmunidad del hospedador y el desarrollo de drogas y

vacunas, donde el modelo de ratón AG129 ha demostrado ser uno de los únicos en estos tiempos que permite la infección por los cuatro serotipos del virus, contribuye con la replicación del virus en tejidos y tipos celulares relevantes comparables con la infección humana y favorece la protección mediada por anticuerpos, además de permitir evaluar hipótesis originadas de observaciones epidemiológicas y de experimentos *in vitro* en un sistema *in vivo* con una respuesta inmunitaria adaptativa funcional (Williams *et al.*, 2009).

En humanos, el título viral es apenas detectable (10^3), comparado con el 50% de la dosis de infección del mosquito (MID_{50}) que corresponde a más de $10^{8.5} \text{MID}_{50}$. Usualmente, los picos de viremia al momento o poco antes del inicio de la enfermedad pueden permanecer detectables por varios periodos en un rango de 2 a 12 días, dependiendo de la cepa viral y del estatus inmunitario del individuo (Rosen *et al.*, 1974; Gubler *et al.*, 1981). Se ha sugerido que la severidad de la enfermedad asociada con la infección por dengue se determina por el número de células infectadas con el virus y que este número se relaciona con el fenómeno de ADA en leucocitos de sangre periférica en infecciones secundarias (Innis, 1995). Por consiguiente, las viremias deberían ser más altas en infecciones secundarias, pero este hecho no concuerda con trabajos experimentales en primates inferiores, ni con estudios clínicos en seres humanos, sino que se ha evidenciado lo contrario, donde las viremias son usualmente más altas en infecciones primarias (Gubler *et al.*, 1981; Eram *et al.*, 1979; Scherer *et al.*, 1978). En infecciones secundarias, el virus puede encontrarse opsonizado por anticuerpos, siendo indetectable por la mayoría de las

técnicas actuales de aislamiento viral. Sin embargo, los estudios en humanos durante un brote de DENV-2 en una isla del Pacífico (Tonga) mostraron gran variación en la magnitud y duración de la viremia en las infecciones primarias (Gubler *et al.*, 1978).

Estudios moleculares han demostrado que los serotipos del DENV varían genéticamente en la naturaleza; desafortunadamente, los cambios fenotípicos que han sido observado aún no se han asociados con cambios genéticos en el virus (Lanciotti *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1993; Rico-Hesse *et al.*, 1990). No obstante, los datos sugieren que los factores virales desempeñan un papel importante en la patogénesis de la forma severa de la enfermedad.

I.5.2.- Factores inmunitarios del huésped.

La patogénesis del DH aún no está clara, pero se ha sugerido el papel de los factores del huésped, tales como:

I.5.2.1.- Observaciones epidemiológicas.

Algunos factores que han sido postulados por ser importantes en la patogénesis del DH, incluyen la virulencia viral, genotipo, antecedentes genéticos del huésped, raza, edad, activación de células T, carga viral y autoanticuerpos (Añez, 2007; Halstead *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 1990). Diversos estudios han tratado de demostrar el papel de la inmunopatogénesis del dengue, señalando que la asociación clínica y epidemiológica tanto de los factores inmunológicos como virales,

determinan la severidad de la enfermedad (Leitmeyer *et al.*, 1999; Marianneau *et al.*, 1998). Una explicación de la patogénesis del dengue puede justificar características específicas de observaciones clínicas, patológicas y epidemiológicas.

Existe una amplia evidencia, principalmente obtenida en estudios *in vitro*, que sugieren que los anticuerpos heterotípicos no-neutralizantes unidos al DENV, facilitan la entrada de estos virus a las células de la línea monocítica, permitiendo así la infección. Estos datos, obtenidos de observaciones epidemiológicas señalan que la mayoría de los pacientes con casos reportados de DH, han experimentado infección secundaria, lo cual corrobora la hipótesis que señala que los anticuerpos anti-dengue heterotípicos preexistentes son un factor de riesgo para el desarrollo de DH (Kliks *et al.*, 1989; Halstead SB, 1980 y 1989).

Por otra parte, la infección con un serotipo induce inmunidad protectora de por vida a las infecciones subsecuentes por serotipos homólogos, pero confiere solo protección parcial y transitoria contra infecciones por los otros tres serotipos. Por el contrario, ha sido aceptado que la infección secundaria o infecciones múltiples con varios serotipos de DENV representan un factor de riesgo importante para el desarrollo de DH/SCD debido al fenómeno conocido como ADA, la cual sucede cuando el virus infectante forma un complejo con anticuerpos no neutralizantes a través de los receptores de la porción Fc en las células fagocíticas – mononucleares. La replicación del virus induce a estas células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas

típicas del DH (Kurane *et al.*, 1994; Morens *et al.*, 1990). Se piensa que los anticuerpos con reactividad cruzada para los serotipos de infecciones previas se unen a viriones sin neutralizarlos y aumenta la entrada del virus en los monocitos, por lo que incrementa el número de monocitos infectados por el virus. Como resultado, los niveles de activación de las células T incrementan marcadamente, reflejando la elevada presentación de antígeno, frecuencia de células T específicas para el virus dengue aumentada en infección secundaria, y la rápida activación y proliferación de linfocitos T de memoria (Lei *et al.*, 2001).

I.5.2.2.- Efecto del DENV sobre plaquetas.

La trombocitopenia es común en el DC y siempre se ha encontrado en casos de DH/SCD (Burke *et al.*, 1988; Bhamarapravati *et al.*, 1967). La patogenia de la trombocitopenia está pobremente comprendida. Se sugirió que el DENV inducía supresión de médula ósea deprimiendo la síntesis de plaquetas, dando lugar así a la trombocitopenia (La Russa and Innis, 1995). El DENV-2 puede también unirse a plaquetas humanas en presencia de anticuerpos específicos contra el virus, y se propuso un aclaramiento inmunomediado de las plaquetas para implicarlo en la patogénesis de la trombocitopenia en el DH/SCD (Wang *et al.*, 1995). Se han reportado autoanticuerpos IgM anti-plaquetas en pacientes con dengue o en ratones infectados con el virus (Lin *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2000). El título de anticuerpos IgM anti-plaquetas es más alto en DH/SCD que en los pacientes con DC. La presencia de estos autoanticuerpos no sólo induce lisis plaquetaria vía activación del complemento, sino que también inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP.

Aunque no se han reportado diferencias o correlación entre los niveles de IgM anti-plaquetarios con el conteo de plaquetas en recién nacidos y niños con DH/SCD, o DH sin choque en relación a SCD, los autoanticuerpos anti-plaquetas pueden contribuir a la destrucción de las mismas (Lin *et al.*, 2006).

I.5.2.3.- Efecto del DENV sobre células endoteliales.

I.5.2.3.1.- Vasculopatía.

La principal característica del DH/SCD y el mejor indicador de severidad de la enfermedad es la pérdida de plasma. La pérdida de plasma se debe a un incremento difuso capilar en la permeabilidad capilar y se manifiesta como cualquier combinación de hemoconcentración, derrame pleural o ascitis. Por lo general, se hace evidente en los días 3-7 de la enfermedad, tiempo durante el cual desaparece la fiebre (Burke *et al.*, 1988; Bhamarapavati *et al.*, 1967). La pérdida de plasma se produce sistémicamente, avanzando rápidamente, pero se resuelve en 1 o 2 días en pacientes que reciben resucitación adecuada de líquidos. No se observa ningún tejido subsecuente o alguna disfunción orgánica. Aunque el edema perivascular es obvio, no se ha reportado destrucción de células endoteliales vasculares. Anteriormente se pensaba que la pérdida de plasma se debía a alteración en la permeabilidad vascular, en lugar de destrucción estructural de las células endoteliales. La alteración funcional de las células endoteliales es causada probablemente por efectos estándares de citoquinas o mediadores liberados en la infección por el virus. El DENV puede infectar células endoteliales *in vitro*, las cuales

conducen a apoptosis, así como también, a la producción de citoquinas y quimioquinas tales como IL-6, IL-8 y RANTES, pero no ha sido demostrado en biopsia de humanos con DH/SCD (Avirutnan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha reportado que los anticuerpos anti-NS1 y anti-prM pueden producir reacción cruzada con células endoteliales no infectadas con dengue e inducir que estas experimenten apoptosis. Dado que el endotelio juega un papel importante en el mantenimiento de la hemostasis, el daño de las células endoteliales durante la infección alteraría el balance procoagulante/anticoagulante del endotelio e incrementaría la tendencia al sangrado (Lei *et al.*, 2008).

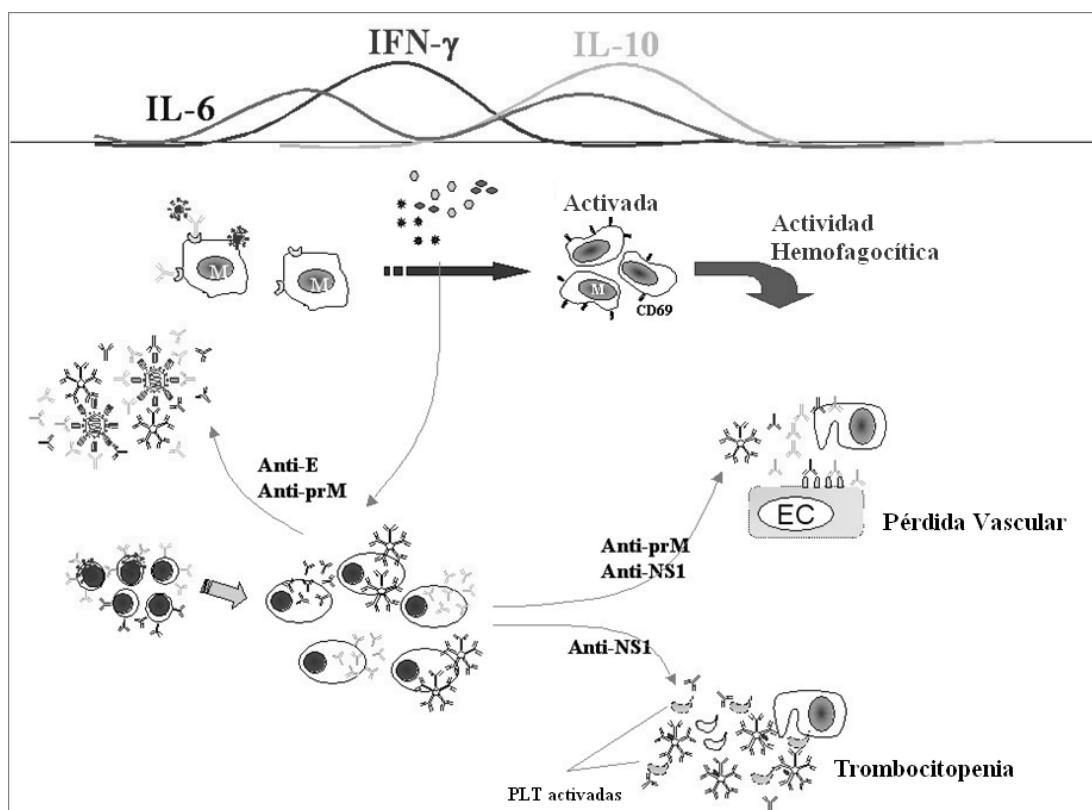


Figura 6. Inmunopatogénesis del dengue asociada a autoanticuerpos.
Fuente: Lei *et al.*, 2008.

I.5.2.3.2.- Coagulopatía.

Algunas infecciones virales pueden causar anormalidades hemostáticas. La hemorragia es una consecuencia de uno o más grados pronunciados de trombocitopenia y se asocia a disfunción plaquetaria o a coagulación intravascular diseminada. En las manifestaciones hemorrágicas inducidas por el virus dengue, las alteraciones vasculares plaquetarias son más comunes, pero a medida que progresa la severidad de la enfermedad, puede ocurrir hemorragia masiva con coagulación intravascular diseminada. La hemostasia se mantiene debido al balance entre la coagulación y la fibrinólisis. El sistema de coagulación puede ser activado tanto por vía intrínseca como extrínseca para formar trombina, la cual convierte el fibrinógeno en fibrina. Por el contrario, el sistema fibrinolítico, puede romper la fibrina en productos de degradación de la fibrina. En el humano se compone de plasminógeno, una proenzima, que puede activar a la enzima. El activador endógeno principal del plasminógeno es el activador de plasminógeno tisular (APt), la cual es una proteína proteolítica implicada en la disolución de los coágulos de sangre y es sintetizada por las células endoteliales (**Bachmann and Kruithof, 1984**). El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), que es producido por plaquetas, hígado y endotelio, por otro lado, es el principal inhibidor del APt. En general, la activación de la coagulación desencadena una activación secundaria de la fibrinólisis, que es rápidamente cortada por la liberación de grandes cantidades de PAI-1 (**Van Gorp et al., 1999**).

Durante la infección aguda por el DENV se alteran los parámetros de la coagulación, tales como conteo de plaquetas, tiempo parcial de tromboplastina

activada (TPTA), así como los parámetros fibrinolíticos APt y PAI-1. El TPTA se prolonga, mientras que el APt aumenta. Tanto la coagulación como la fibrinólisis se activan, y esta activación es mucho más severa en pacientes con DH/SCD que en DC. Después de la convalecencia, hay elevación de los niveles de PAI-1 y conteo de plaquetas, los cuales son concomitantes con la disminución del nivel de APt y regresa a la normalidad el TPTA. La relación APt/PAI-1 más alta en pacientes con DH/SCD que en los pacientes DC. La prolongación del TPTA y la relación APt/PAI-1 incrementada en la fase aguda de la infección por el virus se correlaciona con la severidad de la enfermedad y puede ser utilizada como indicadores tempranos de DH/SCD (Huang *et al.*, 2001). El TPTA y el tiempo de protrombina (TP) son indicadores de las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación, respectivamente. Sólo el TPTA, no así el TP, se prolonga en la infección por DENV, lo que sugiere que ocurre una alteración en la vía intrínseca de la coagulación. Esto puede ser causado por una baja regulación de síntesis de factores específicos o por aumento del consumo de estos factores. Dado que se ha encontrado hepatitis leve en la infección por DENV, un análisis sobre la correlación y regresión lineal entre los niveles de aspartato amino transferasa (AST)/alanino amino transferasa (ALT) y TPTA muestran una fuerte asociación entre la elevación de las transaminasas y la prolongación del TPTA en pacientes con DH. La disfunción hepática podría ser responsable de la disminución en la síntesis de factores específicos en la vía intrínseca. El consumo incrementado de los factores como lo indican los altos niveles de APt se asocian también con la prolongación del TPTA, pero de manera menos significativa. Por lo tanto, tanto la

síntesis disminuida, como el consumo incrementado de los factores de coagulación se relacionan con la prolongación del TPTA (Lei *et al.*, 2008).

I.5.2.4.- El sistema de complemento.

El complemento es un sistema de proteínas séricas constitutivas y organizadas en forma secuencial y ordenadas sobre la superficie de la célula blanco, trayendo como consecuencia lisis o destrucción de la célula blanco (Abbas, 2009). La activación de la cascada del complemento desencadena funciones antivirales tales como opsonización y/o lisis del patógeno, y respuesta inmunitaria adaptativa inmediata (Avirutnam *et al.*, 2008).

Este sistema se activa por un complejo virus – anticuerpo, así como también, por varias citoquinas, para liberar C3a y C5a que también tienen efectos directos sobre la permeabilidad vascular. La activación del complemento puede causar enfermedad severa, pero no es la causa de la aparición de DH/SCD (Lei *et al.*, 2001). Thein *et al.*, 1994, encontraron niveles de C3 disminuidos y niveles normales de C4 en pacientes con dengue, tanto en DC como en SCD durante la fase aguda de la enfermedad.

I.5.2.5.- Proteína C Reactiva.

La PCR es una de las proteínas plasmáticas producidas en el hígado, designadas como “reactantes de fase aguda”, cuyos niveles incrementan

rápidamente en respuesta a estrés, daño tisular y una variedad de estímulos inflamatorios. Se observan niveles elevados en suero después de trauma, necrosis del tejido, infección, cirugía e infarto al miocardio (Aziz *et al.*, 2003). La PCR es regulada por citoquinas pro-inflamatorias, primordialmente por TNF- α e IL-6 (Castell *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1990). Durante una respuesta de fase aguda, hay incremento rápido en la producción de PCR, lo que causa la liberación de cantidades elevadas en la circulación (Yue *et al.*, 1996). La PCR interactúa con el componente C1q e inicia la cascada del complemento, dado que se ha demostrado ser un activador *in vivo* e *in vitro* (Torzewski, 1998). Esta proteína ha sido evaluada en pacientes infectados en terapia intensiva, observándose una correlación significativa entre las concentraciones de PCR e IL-6 (Sheldon *et al.*, 1993). Sin embargo, Juffrie *et al.*, (2001), no encontraron diferencias en las concentraciones de PCR entre pacientes con IL-6 elevada con respecto al grupo control con niveles normales, no obstante, se incrementó en un tercio de los pacientes con dengue.

I.5.2.6.- Efecto del DENV sobre monocitos.

En la respuesta inmunitaria ante una infección por DENV, los monocitos/macrófagos (Mo/M ϕ) son las células más importantes como blanco del virus en la infección natural en humanos, siendo éstas las responsables de la diseminación del virus después de su entrada inicial a través de la picadura del mosquito vector, pudiendo ser elemental en los pasos iniciales de la amplificación de la respuesta inmunitaria en algunos pacientes con dengue. Estas células después de ser activadas presentan propiedades inflamatorias, tumoricidas, antimicrobiales y

antivirales (Kou *et al.*, 2008; Gubler, 1998; Bercherman *et al.*, 1993; Croen, 1993; Karupih *et al.*, 1993). Además, pueden liberar varios mediadores en respuesta a la infección por el virus dengue, los cuales incluyen interleuquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que puede interferir con la replicación del virus y/o iniciar un proceso inflamatorio durante el curso del dengue (Espina *et al.*, 2003).

El DENV, infecta primariamente monocitos (Mo) y macrófagos tisulares (M ϕ) productivamente, sin tomar en cuenta el estado de diferenciación celular (Chen *et al.*, 2002). Los mediadores solubles liberados de Mo/M ϕ infectados con DENV ejercen efectos importantes sobre las propiedades biológicas de las células endoteliales y hematopoyéticas (Anderson *et al.*, 1997; Shaio *et al.*, 1995), lo que sugiere que la interacción del virus con estas células puede jugar un papel crucial en la patogénesis del dengue.

En la infección por DENV, las citoquinas pueden ser liberadas tanto directamente de células infectadas por virus tales como monocitos/macrófagos, como en interacciones de células infectadas por virus con otras células inmunitarias, tales como linfocitos T activados. Por este mecanismo es que se involucra la activación de los macrófagos infectados con virus con la producción de TNF- α , Interleuquina-6 (IL-6) e Interleuquina-1 β (IL-1 β) (Yang *et al.*, 1995). Estas citoquinas pro-inflamatorias están asociadas *in vivo* con la respuesta de fase aguda, y puede causar la liberación de péptidos quimiotácticos, fiebre y activación de células endoteliales conduciendo a

permeabilidad vascular, la cual puede ser uno de los fenómenos involucrados en la patogénesis de la infección (Cardier *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 1997).

I.6.- Citoquinas.

Son polipéptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Aunque en general están producidas por leucocitos, determinadas citoquinas pueden también ser por otros muchos tipos celulares. Originariamente se estableció el término linfoquina para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno. Posteriormente su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término más amplio de citoquina. Las citoquinas incluyen a las interleuquinas (IL), linfoquinas, interferones, monoquinas y quimioquinas. El término interleuquina se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, entre otras). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral) y el TGF (factor transformador de tejidos) (Crufs *et al.*, 1997).

Las citoquinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células

efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y recirculación de leucocitos (**Alvarez-Mon et al., 1985**).

Presentan una serie de características funcionales comunes, tales como: 1) La secreción de citoquinas es un suceso breve y autolimitado. En general no se almacenan en la célula, y su síntesis se inicia por una nueva transcripción génica de corta duración. La síntesis de citoquinas es por tanto, un proceso transitorio. 2) El radio de acción de las citoquinas es corto, siendo su modo de acción autocrino, yuxtacrino o paracrino. 3) Las citoquinas producen sus efectos uniéndose a receptores específicos de alta afinidad alterando en las células diana los patrones de expresión génica. 4) Muchos tipos individuales de citoquinas, pueden producirse por diversos tipos celulares. Por ello, se tiende cada vez más a denominar a estas moléculas como citoquinas, en vez de linfoquinas o monoquinas. 5) Sus acciones se solapan ya que son realizadas por varios tipos de citoquinas diferentes. 6) Es usual que un tipo de citoquina influya sobre la síntesis de otro, produciéndose cascadas en las que una segunda o una tercera citoquina, puede mediar las mismas acciones biológicas de la primera, o suprimirlas. Esta propiedad de aumentar o suprimir la producción de otras citoquinas, proporciona un mecanismo regulador muy importante para las respuestas inmunitarias. 7) A menudo, dos citoquinas pueden tener un efecto sinérgico, aunque también en ocasiones distintas citoquinas tienen efectos antagónicos. 8) Las citoquinas son moléculas pleiotrópicas, es decir actúan sobre diferentes tipos de células induciendo sobre ellas efectos variados. En muchos casos, una citoquina puede interaccionar con diferentes tipos celulares que expresan receptores para ella, o

puede ocurrir un efecto de redundancia donde varias citoquinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular. 9) Una única célula presenta receptores para múltiples citoquinas. 10) La unión de una citoquina a su receptor altera la expresión de receptores tanto para la propia citoquina como para otras (Abbas, 2009; Curfs *et al.*, 1997).

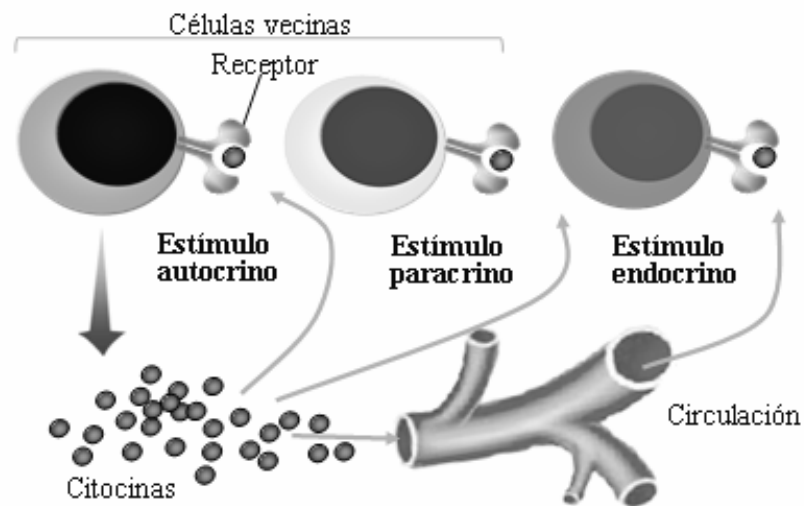


Figura 7. Efecto autocrino, paracrino y yuxtacrino de las citoquinas.

Fuente: http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/texto_pdf/tema_09.pdf

I.6.1.- Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF- α).

El TNF- α es una proteína que se presenta en forma libre y como molécula de membrana. Es producido por células T activadas, mastocitos y macrófagos tras estimulación por endotoxinas bacterianas, factor estimulador de colonias de macrófago (M-CSF), IFN- γ IL-2 ó IL-15. El TNF- α fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo, y causante de necrosis hemorrágica de tumores *in vivo*. Además, es el principal mediador de la respuesta inmunitaria frente a bacterias Gram negativas,

donde el estímulo más potente para su producción son los lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Después de la actuación por LPS, el IFN- γ regularía positivamente su síntesis (Vassalli P, 1992).

El TNF- α ejerce numerosos efectos *in vivo* que son muy dependientes de su concentración. A concentraciones bajas el TNF- α actúa localmente como un mediador paracrino que provoca aumento de la adhesividad de las células endoteliales de los vasos, activación leucocitaria y estimulación de la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 en los fagocitos mononucleares. También co-estimula la activación de linfocitos T y B. En células del endotelio vascular y fibroblastos, estimula la producción de CSFs y aumenta la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de clase I. Cuando las cantidades de TNF- α son mayores, éste actúa de modo endocrino y provoca acciones sistémicas: estimula la producción de reactantes de fase aguda por el hígado y la producción de IL-1 e IL-6 en células del endotelio vascular; activa el sistema de coagulación e induce fiebre; suprime la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea y contribuye a la inducción del estado caquético. Las concentraciones extremadamente elevadas de TNF- α deprimen la contractilidad del miocardio con la consiguiente reducción de la perfusión tisular, relajan el tono del músculo liso vascular, contribuyendo a la disminución de la presión sanguínea y provocan CID (Vassalli P, 1992).

El TNF- α induce aumento de la expresión de moléculas del MHC de clase I sobre los monocitos y liberación de IL-1, cuyas propiedades biológicas solapan a las

del TNF- α . Los linfocitos T en reposo carecen de receptores para TNF- α , que aparecen tras su estimulación antigénica. Sobre las células T activadas el TNF- α incrementa el número de receptores para la IL-2, aumenta la proliferación y la producción de IFN- γ inducidas por la IL-2. Los linfocitos T activados secretan simultáneamente TNF- α e IFN- γ . También los linfocitos B producen TNF- α cuando son activados por el antígeno. En presencia de IL-2, el TNF- α incrementa la expresión de receptores para IL-2 en células NK y LAK, así como su actividad citotóxica. Parece probable la existencia de algún lazo de regulación autocrino, ya que las células NK son capaces de producir TNF- α (Vassalli P, 1992).

El TNF- α se conoce por ser uno de los más potentes factores activadores de células endoteliales e inductores de la permeabilidad capilar (Pober *et al.*, 1990). Esta citoquina es liberada por monocitos infectados por DENV (Anderson *et al.*, 1997), y se ha sugerido que existe fuerte correlación entre las altas concentraciones de TNF- α séricas y la severidad del DH (Braga *et al.*, 2001; Hober *et al.*, 1998).

I.6.2.- Interleuquina 1 (IL-1).

La IL-1 es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, NK y otros tipos celulares. Existen dos formas, IL-1 α e IL-1 β que, aunque solamente tienen un 25% de homología en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares. Parte de sus efectos pro-inflamatorios se debe a que induce la liberación

de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. Es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. También promueve la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa sobre el SNC induciendo sueño y anorexia, típicamente asociados con los procesos infecciosos (Abbas, 2009).

Así mismo, la IL-1 actúa sobre una variedad de células para generar un rango de acciones incluyendo crecimiento linfocitario, proliferación fibroblástica, proteólisis muscular, fiebre y leucocitosis, ya sea directamente o vía IL-6 (Akira *et al.*, 1990).

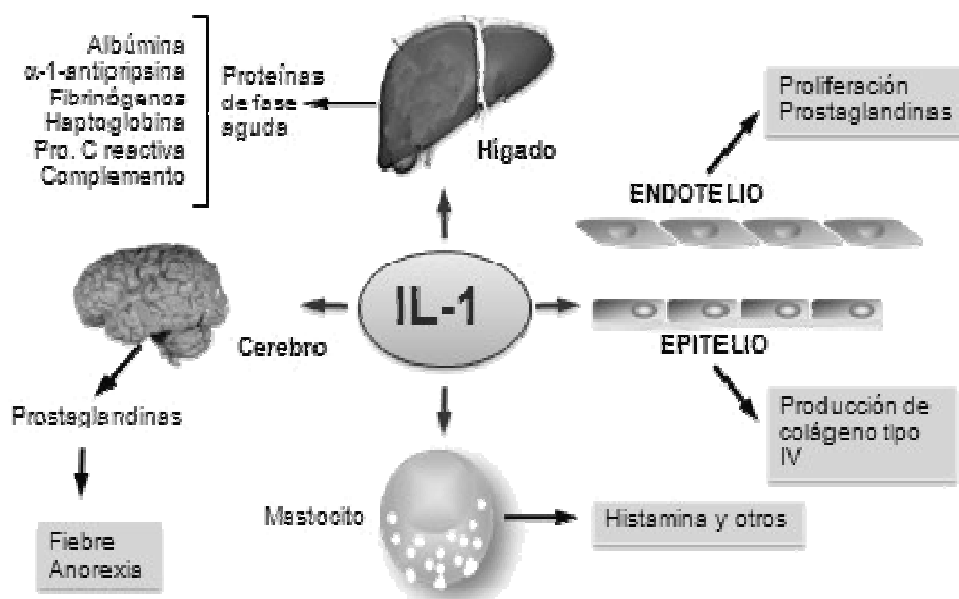


Figura 8. Acciones de la IL-1 sobre diferentes órganos.

Fuente: http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/texto_pdf/tema_09.pdf

I.6.3.- Interleuquina 6 (IL-6).

La IL-6 es una glicoproteína producida por diversos tipos celulares tras su activación por virus, IL-1 o TNF- α . El receptor de IL-6, CD126, está presente en las células T en fase quiescente, y su expresión no aumenta tras la estimulación antigénica. Por el contrario, las células B en reposo carecen de receptores para IL-6, adquiriéndolos después de su activación. Es producida fundamentalmente por Mo/M ϕ , fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos dependientes de la IL-3. Esta interleuquina favorece la diferenciación de células B humanas, sobre las células B *in vitro* aumenta la síntesis y secreción de inmunoglobulinas sin estimular cambios en el isotipo. La IL-6 precisa de la IL-2, aunque sea en cantidades mínimas, para ejercer su acción favorecedora de la diferenciación. Además, actúa como coestimulador de la activación de las células T y de los timocitos (**Barton BE, 1996**).

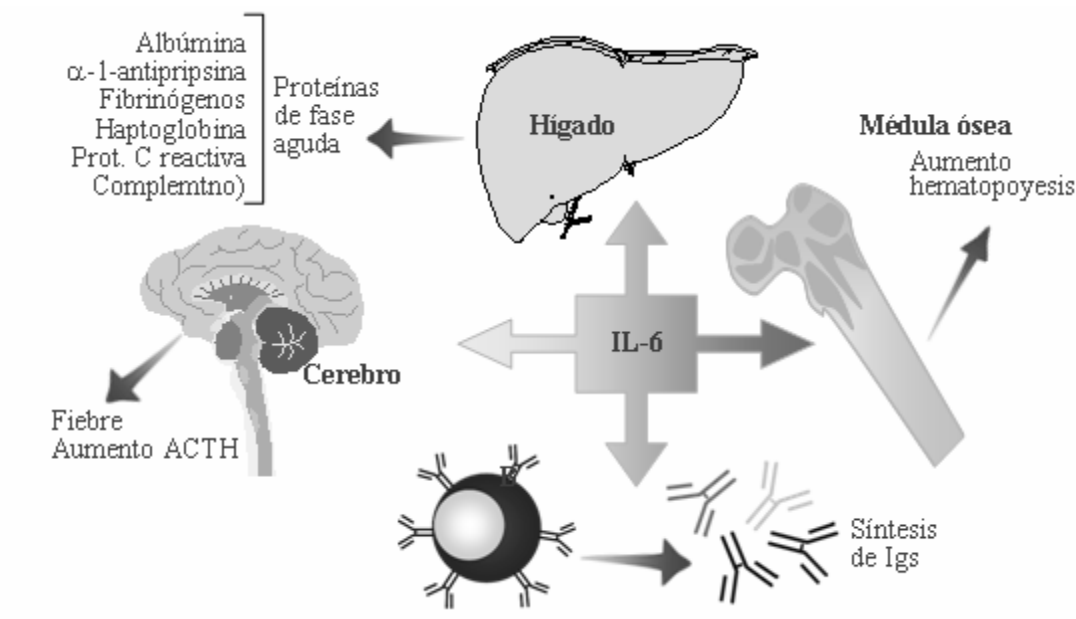


Figura 9. Acciones biológicas de la IL-6 sobre diferentes órganos.

Fuente: http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/texto_pdf/tema_09.pdf

Lei *et al.*, 2001, señalan que la IL-6 tiene un papel dual en dengue, tanto pro-inflamatorio como de mediador anti-inflamatorio, su análisis cinético mostró una alta variación a diferentes tiempos y en diferentes individuos, pero ocurrió una elevación alta y transitoria tanto en el día 7 como en los días 9-11 después del inicio de la fiebre. Esto sugiere que cuando un huésped responde a la infección por DENV vía generación de citoquinas inflamatorias, simultáneamente, también hay generación de citoquinas inhibitorias para contrarrestar la inflamación.

Existen pocos datos sobre la importancia de la IL-6 en pacientes infectados con dengue (Hober *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1999). Algunos estudios muestran una correlación entre la severidad de la enfermedad y los niveles de IL-6, lo que se evidencia en niveles más altos de esta citoquina en pacientes con DH/SCD (Iyngkaran

et al., 1995; Hober *et al.*, 1993). En estudios prospectivos, los niveles de IL-6 tienden a ser más bajos en pacientes en choque que en aquellos que no lo están (Bethell *et al.*, 1998), por lo tanto, el papel potencial de esta citoquina en la patogénesis de las formas severas del dengue permanece incierto.

Las citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α juegan un papel significativo en el desarrollo de la respuesta inflamatoria aguda y aunque se han reportado niveles más altos de TNF- α e IL-6 en pacientes con dengue, no se ha encontrado una asociación definitiva con la severidad de la enfermedad (Bethell *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 1998; Iynkaran *et al.*, 1995; Hober *et al.*, 1993; Yadav *et al.*, 1991). Sin embargo, Kurane y Ennis, (1994), reportaron que el IFN- α es capaz de inhibir la infección por DENV en monocitos humanos.

Por otra parte, la autofagia es un mecanismo de respuesta celular en contra del estrés causado por la infección de virus y bacterias. El DENV es capaz de activar la maquinaria enzimática favorable para su replicación. Se ha descrito que el DENV-2 puede desencadenar procesos autofágicos en diversas líneas celulares infectadas, y que este proceso inducido posteriormente incrementará los títulos virales intra y extracelularmente, indicando que la autofagia puede promover la replicación viral en células infectadas (Panyasrivanit *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008).

I.7.- Respuesta oxidativa ante la infección por virus dengue.

El estrés oxidativo provocado por una infección viral es parte de los mecanismos generales de respuesta inflamatoria del organismo ante una infección viral, bacteriana o parasitaria. Se ha sugerido que el estrés oxidativo generado por estos agentes, se debe a la activación de los leucocitos y de las células encargadas de la respuesta inmunitaria en todos los órganos, ya que son ellos los principales productores de radicales libres de oxígeno (RLOx) cuando son activados como parte de la respuesta inmunitaria que desarrolla el organismo (Peterhans, 1997; Gil *et al.*, 2004; Dalle-Donne *et al.*, 2006).

I.7.1.- Radicales Libres.

Desde el punto de vista molecular, los radicales libres son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. No obstante, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis (Beckman *et al.*, 1996; Naqui *et al.*, 1996).

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son: Radical hidroxilo (HO[•]), Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Anión superóxido (O₂⁻), Oxígeno singlete (¹O₂), Óxido nítrico (NO), Peróxido (ROO), Semiquinona (Q) y Ozono (Venereo, 2002).

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de ROXs se encuentran los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Mientras que las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (Expósito *et al.*, 2000; Turrens, 1994).

I.7.1.1.- Óxido Nítrico.

El Óxido Nítrico (NO) se conoce por ser un radical libre gaseoso que media algunas funciones biológicas vitales, incluyendo la defensa del huésped, habiéndose descrito previamente entre sus múltiples propiedades efecto antiviral (Croen *et al.*, 1993), así como intervenir en el balance oxidación/antioxidación en células de la inmunidad (Valero *et al.*, 2002). Muchos tipos de células son capaces de producir NO a través de la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintetasa inducible (NOSi) (Moncada *et al.*, 1991; Nathan *et al.*, 1991).

Además, el NO en base a su naturaleza química, proporciona un marco conceptual que ayuda a distinguir entre las consecuencias benéficas y tóxicas de este radical. Añez *et al.*, (2007), señalan que concentraciones elevadas de NO pueden ser benéficas durante la infección por dengue por sus efectos antivirales y apoptóticos; sin embargo, también podría participar en la fisiopatogénesis de la forma severa de la enfermedad, debido al daño que ocurre en las células endoteliales.

Por su parte, Marianneau *et al.*, (1999), han demostrado la producción incrementada de NO en cultivos de células de Kupffer y células esplénicas infectadas con el virus dengue. Así, Valero *et al.* (2002), encontraron concentraciones elevadas de NO en pacientes con DC infectados con los serotipos 1, 2 y 4, a diferencia de pacientes con DH, donde se encontraron niveles similares a los controles sanos. Estas observaciones aumentan la posibilidad que la producción de NO puede estar presente en el paciente durante el curso de la infección por dengue, pero aún existen muchas incógnitas por despejar en cuanto al papel del NO en las infecciones virales.

Sin embargo, Espina *et al.*, (2003), no fueron capaces de detectar la producción de NO en cultivos de monocitos infectados con DENV-2. A diferencia de los datos reportados por Neves-Sousa *et al.*, (2005), los cuales fueron los primeros en revelar la activación de monocitos infectados por DENV-1, basados en la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) tanto *in vivo* como *in vitro*, así como también la susceptibilidad de DENV-1 a la producción de NO.

Por su parte, el incremento del estado de oxidación sobre los mecanismos antioxidantes parece jugar un importante papel en las enfermedades virales, aunque existen solo algunos estudios que han descrito *in vivo* o *in vitro*, el estado de este balance oxidación/antioxidación en dengue (Gil *et al.*, 2004; Klassen *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 1999).

En un estudio previo, se reportó que pacientes con DC tienen concentraciones séricas de NO mayores que la observada en pacientes con DH (Valero *et al.*, 2002). Marianneau *et al.*, (1999), demostraron expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS) en células de Kupffer luego de la exposición al virus de forma constante, sugiriendo producción sostenida de NO. Sin embargo, no se observó incremento en las concentraciones de este radical en cultivos primarios de monocitos de adultos infectados con DENV-2 (Espina *et al.*, 2003).

I.7.1.2.- Malondialdehído (MDA).

El MDA es un producto final de la peroxidación lipídica que puede servir como marcador del estrés oxidativo y de la injuria tisular mediada por RLOx. Durante el estrés oxidativo, los RLOx reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, lo que genera un metabolito final, el MDA, que se identifica en el laboratorio e indica la presencia de RLOx, cuya concentración es directamente proporcional al daño en el organismo (Nielsen *et al.*, 1997). A su vez, el estrés oxidativo altera la actividad de las principales enzimas antioxidantes, por lo cual la

determinación de su actividad es una medida de los sistemas antioxidantes defensivos del organismo contra la acción deletérea de estas especies reactivas (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Gutiérrez-Salinas, 2006).

El papel de esta molécula en la infección por dengue no se ha determinado. Sin embargo, en otras infecciones virales como en la infección por Citomegalovirus demuestran que las modificaciones en las actividades de estas enzimas y el incremento en los niveles de MDA sugieren la presencia de un estrés oxidativo en niños que presentan una infección activa por este virus, quienes son más susceptibles a estos ataques y pueden sufrir mayor daño, con secuelas permanentes, contribuyendo así al proceso fisiopatológico de la enfermedad (Gutierrez *et al.*, 2009).

I.7.2.- Antioxidantes.

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (Thomas, 1994).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies

reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente, ya sea, membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante se debe a su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN), funcionalmente vitales o más importantes (Reitter, 1995). Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos (Jakoky and Ziegler, 1990). Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (Venereo, 2002).

Aunque el papel de las enzimas antioxidantes en la infección por virus dengue no ha sido completamente dilucidado, el incremento del estado de oxidación sobre los mecanismos antioxidantes parece jugar un importante papel en las enfermedades virales. Sin embargo, existen solo algunos estudios que han descrito *in vivo* o *in vitro*, el estado de este balance oxidación/antioxidación en esta enfermedad (Gil *et al.*, 2004; Klassen *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 1999).

I.7.2.1.- Catalasa (CAT).

La CAT es una enzima que tiene una amplia distribución en el organismo humano, presenta una alta concentración en hígado y riñón y baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente no se detecta en tejido nervioso y se

localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas y citosol (eritrocitos). Presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Céspedes *et al.*, 1996).

No se han encontrado reportes en cuanto al papel de la CAT en pacientes con infección por dengue, sin embargo, estudios realizados en otras infecciones virales han demostrado incremento en la actividad de esta enzima en niños con infección por CMV (Gutierrez *et al.*, 2009).

I.7.2.2.- Superóxido dismutasa (SOD).

Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu- SOD y Zn-SOD: contienen cobre y cinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; Mn-SOD: contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; Fe-SOD: contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. coli*. Estas enzimas dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido (Céspedes *et al.*, 1996).

En estudios realizados en pacientes con dengue, se ha encontrado niveles incrementados de esta encima en relación al grupo control, sugiriendo que la alteración en el estado oxido-reducción podría causar incremento en el estrés

oxidativo y jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Gil *et al.*, 2004).

I.7.2.3.- Glutación peroxidasa (GPx).

Es una enzima selenio dependiente. Cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH) y se localiza en citosol (eritrocitos), lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmunitario). Existen 3 formas de GPx: GPx-c o forma celular que tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido; GPx -p o forma extracelular que presenta afinidad semejante para ambos sustratos; y la GPx-PH la cual presenta afinidad específica para los lipoperóxidos. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos (Céspedes *et al.*, 1996).

Aunque algunos autores han reportado disminución en las concentraciones de glutatión en pacientes con dengue clásico, el papel de este antioxidante no está totalmente esclarecido (Klassen *et al.*, 2004).

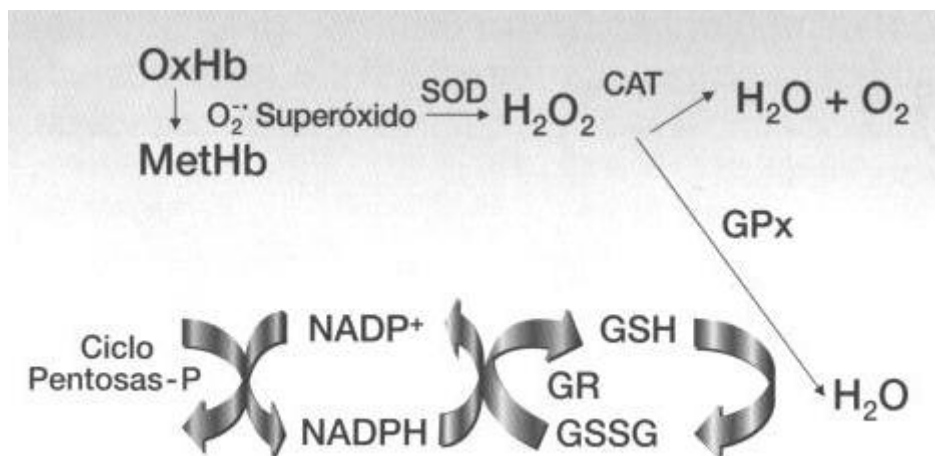


Figura 10. Antioxidantes enzimáticos.

Fuente: <http://www.institutobiologico.com/seminarios/stop%20al%20envejecimiento.htm>

I.8.- Apoptosis.

En cuanto al proceso activo de muerte celular programada o apoptosis, es interesante destacar que es una de las consecuencias más importantes de la infección por DENV tanto *in vitro* como *in vivo* y es considerado como una característica importante de la patogénesis viral (Marianneau *et al.*, 1998, Mosquera *et al.*, 2005). Marianneau *et al.*, (1998), demostraron que la replicación del virus dengue induce apoptosis en neuronas de ratones y en hepatocitos humanos y que la habilidad de activar esta vía depende tanto de determinantes virales como celulares. De hecho, las células citotóxicas activadas durante la respuesta inmunitaria antiviral y la activación de células fagocíticas asociadas con la producción de citoquinas pueden causar daño tisular local o desbalances transitorios en la homeostasis. Además, la apoptosis inducida por el DENV puede ser considerada como una

característica importante de la patogénesis viral (**Mosquera *et al.*, 2005; Marianneau *et al.*, 1998**).

En la infección viral primaria, el DENV podría inducir apoptosis en monocitos, pero además, éstos pueden contribuir a los mecanismos de defensa del huésped en contra del virus a través de la fagocitosis viral, fagocitosis de células apoptóticas infectadas y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Dado que, los Mo/Mφ son células fagocíticas activas con componentes lisosomales citoplasmáticos capaces de eliminar microorganismos, y el virus dengue puede inducir muerte celular por mecanismos apoptóticos (**Marianneau *et al.*, 1999; Avirutnam *et al.*, 1998**), la interacción del virus con su principal célula blanco puede provocar efectos deletéreos tanto en los virus como en las células (**Espina *et al.*, 2003**).

Recientemente, se reportó la inducción de apoptosis en monocitos primarios humanos por DENV-2 (**Torrentes-Carvalho *et al.*, 2009**) y un incremento en el número de células apoptóticas cuando se incubaron monocitos humanos de individuos sanos con los diferentes serotipos de DENV (**Levy A. *et al.*, 2010**).

Se ha demostrado que el NO produce apoptosis en macrófagos (**Albina *et al.*, 1993**), al igual que ocurre con el TNF- α que actúa como inductor de apoptosis en diferentes sistemas (**Jaeschke *et al.*, 2000; Niwa *et al.*, 2000**), por lo que se ha sugerido que estos mediadores podrían estar involucrado en la apoptosis durante la infección por dengue. Espina *et al.*, (2003), observaron apoptosis incrementada con

concentraciones elevadas de TNF- α , por lo que esta pudiera estar involucrada de forma autocrina o paracrina en la inducción de apoptosis, y este evento puede ser considerado como una característica importante de la patogénesis viral.

Además, Avirutnan *et al.*, (1998), demostraron que la activación del complemento, la inducción de quimioquinas, y la muerte celular apoptótica pueden actuar en conjunto para causar la pérdida vascular fulminante que es característica del DH/SCD, a través de la evaluación de la infección por virus dengue en células endoteliales, con el fin de investigar la respuesta de las células a la infección y la posible unión entre la infección de las células endoteliales y la activación del complemento.

I.9.- La edad como factor de riesgo en la infección por dengue.

La edad ha sido considerada un factor clave para la evolución del dengue, reportándose riesgo incrementado de padecer DH/SCD en infantes y escolares (González *et al.*, 2008), creyéndose para entonces que solo estaba reservada para esa franja etaria, aun cuando el riesgo verdadero de padecer esta condición y su incidencia actual, no ha sido establecido de manera precisa en adultos y ancianos.

Por su parte, la transmisión vertical del virus Dengue, con la subsiguiente infección del recién nacido en los días posteriores al parto ha sido previamente descrita, siendo el DH una forma de presentación observada más frecuentemente en

niños que en adultos, pudiendo incluso ser causa de muerte neonatal (**Petdachai et al., 2004; Sirinavin et al., 2004; Chotigeat et al., 2003; Janjindamai et al., 2003; Boussemart et al., 2001; Kerdpanich et al., 2001; Thaithumyanon et al., 1994**).

Por otro lado, los recién nacidos humanos poseen un sistema inmunitario que muestra signos de inmadurez que los hace más proclives a infecciones severas. Los mecanismos involucrados en esta respuesta no han sido del todo dilucidados (**Han et al., 2004; Hallwirth et al., 2004**). Sin embargo, los neonatos son notablemente deficientes en respuestas del tipo Th1 (**Levy et al., 2004**).

Otro elemento importante que refuerza las observaciones sobre el efecto de la edad en el desarrollo de formas severas de la infección flaviviral, la constituye el hecho de la mayor susceptibilidad *in vitro* de ratones lactantes a la infección intracraneal por Flavivirus. Esta técnica ha sido usada por mucho tiempo como modelo para el estudio de estos virus (**Monath et al., 2005; Bray et al., 1998; Hotta, 1952**), reconociéndose que la susceptibilidad a Flavivirus neurotrópicos es dependiente de la edad (**Monath, 1986**).

Se ha demostrado que las células mononucleares provenientes de sangre de cordón umbilical, presentan una respuesta disminuida en la expresión de genes para varias citoquinas (M-CSF, G-CSF, GM-CSF, TGF- β , IL-8, IL-11, IL-12, IL-15 y IL-18), comparados con la respuesta de las células del adulto (**Jiang et al., 2004; Hodge et al., 2001**), mientras que la respuesta en la edad avanzada permanece incierta.

Por otra parte, debido a las modificaciones del sistema inmunitario relacionadas con el envejecimiento, las personas de edad avanzada desarrollan una respuesta ineficaz, corriendo mayores riesgos de sufrir enfermedades infecciosas. A menudo, la semiología de las infecciones es atípica en los ancianos y sus signos y síntomas resultan menos evidentes que en los adultos más jóvenes (Raschilas F, 2006).

Existe muy poca información sobre la manera que, la infección viral y los factores específicos del huésped, intervienen en la virulencia y patogenicidad de la enfermedad. Debido a lo antes planteado y tomando en consideración que existen controversias acerca de la patogénesis del dengue, se investigó el papel de los mediadores inflamatorios en la infección por virus dengue y su relación con el serotipo viral infectante y la severidad de la enfermedad, al igual que los efectos del virus dengue sobre la función de los monocitos procedentes de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El dengue es una enfermedad viral endémica, que afecta las regiones tropicales y subtropicales del mundo, predominantemente en áreas urbanas y semi-urbanas. Esta enfermedad adquiere cada vez mayor importancia como enfermedad re-emergente debido a la co-circulación de serotipos del virus, al incremento en el número de casos y consecuentemente a la expansión de áreas epidémicas y a la aparición de casos de dengue hemorrágico/síndrome de choque por dengue (DH/SCD).

El crecimiento de las poblaciones, la urbanización y la propagación del principal mosquito vector, *A. aegypti*, entre otros factores, conducen a la aparición del dengue. Basado en datos epidemiológicos, se ha postulado que la respuesta inmunitaria del huésped contra el virus contribuye con la patogénesis de la forma severa de la enfermedad (DH/SCD). Esta respuesta juega un papel importante para controlar la infección por el virus. Por lo tanto, estas infecciones son un modelo interesante para explorar las interacciones entre el virus y el sistema inmunitario.

Por otra parte, la necesidad de la observación conjunta de los diferentes aspectos inmunológicos relacionados a la evolución hacia DH/SCD, relacionándose con el tipo de infección (primaria o secundaria), el serotipo viral infectante y otras variables individuales como edad y género, tiene como finalidad realizar aportes al conocimiento de esta compleja enfermedad. La carencia de una vacuna que brinde protección efectiva y duradera contra el virus, hace que esta entidad represente en el mundo uno de los principales problemas de salud pública.

Los Mo/Mφ son unas de las células diana más importante en la infección por DENV. La interacción del virus con estas células desencadena diferentes procesos biológicos de respuesta entre los que destacan la expresión de antígenos de superficie ligados a la activación celular y la secreción de citoquinas y otros mediadores. La producción de citoquinas desempeña una función muy relevante en la regulación de la respuesta inmunitaria inducida por la infección del virus, aunque no se conoce con precisión la posible relación entre la intensidad, el patrón de la respuesta secretora de citoquinas producidas y la evolución clínica del cuadro. Por ello, el conocimiento de la inmunopatogénesis de esta enfermedad, es la base fundamental en la búsqueda de alternativas terapéuticas inmediatas que intervengan en la modulación de la respuesta inmunitaria y en el desarrollo de las formas severas del dengue.

Aunque existe mucha información sobre la manera que la infección viral y los factores específicos del hospedador intervienen en la virulencia y patogenicidad de la enfermedad, ésta es controversial y no concluyente. Por ello, el estudio y análisis de la activación de monocitos/macrófagos y células T en pacientes con dengue podría alterar factores séricos como citoquinas proinflamatorias, inmunoglobulinas, proteínas de fase aguda como la PCR y proteínas del complemento, que estarían asociados a diferentes grados de severidad de la enfermedad, al tipo de infección y al serotipo viral infectante, así como la producción de citoquinas, radicales libres y antioxidantes *in vitro*, y el incremento en la apoptosis como posible mecanismo de defensa antiviral, lo cual podría estar influenciado por el estado de maduración de los monocitos dependiendo de la edad del individuo.

OBJETIVOS GENERALES

1. Análisis de mediadores inflamatorios de la respuesta inmunitaria en pacientes con infección por el virus dengue y estudio de su significancia clínica.
2. Análisis del efecto del virus dengue sobre la función y viabilidad de los monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y de ancianos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificación de las concentraciones séricas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 y NO en los pacientes con dengue y en controles sanos.
2. Determinación de los niveles de proteínas del sistema de complemento (C3 y C4) y proteína C reactiva, en suero de pacientes con dengue y en controles sanos.
3. Análisis de la producción de citoquinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), por parte de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con DENV.
4. Análisis del perfil oxidativo (radicales libres: NO), así como la medición de la actividad enzimática y compuestos antioxidantes: Catalasa, Superóxido dismutasa

(SOD), Glutación reducido (GSH); y Malondialdehído (MDA) en cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con DENV.

5. Detección de apoptosis en cultivo de monocitos infectados experimentalmente con DENV procedentes de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos.
6. Análisis de la significación clínica de los hallazgos biológicos encontrados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Población objeto de estudio.

III.1.1.- Pacientes con dengue en fase aguda.

Se estudiaron 70 pacientes con clínica compatible con dengue sin discriminación de edad (3 - 53 años) y sexo que acudieron a las diferentes instituciones de salud del Estado Zulia y a la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina, de la Universidad del Zulia.

III.1.1.1.- Criterios de inclusión basados en la guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue (WHO, 1997).

Dengue en fase aguda: Incluye a todo paciente que presenta fiebre entre dos hasta siete días (fase febril), acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, dolor generalizado, exantema, anorexia, náuseas y vómitos; con o sin manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado de mucosas, prueba de torniquete positiva y leucopenia. Esta fase también incluye a los pacientes en defervescencia entre el 3^{er} y 7^{mo} día de evolución de la enfermedad, con o sin extravasación plasmática.

III.1.1.2.- Criterios de exclusión.

- a) Enfermedad cardiovascular grave (insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión no controlada, enfermedad coronaria y arritmias graves).

- b) Trastornos hematopoyéticos, metabólicos o diabetes, pulmonares, hepáticos o renales.
- c) Otras enfermedades concomitantes infecciosas bacterianas o virales.
- d) Enfermedades autoinmunes.
- e) Que no reciban en los últimos seis meses tratamientos con esteroides, inmunosupresores u otro medicamento que interactué con el sistema inmunológico.
- f) Neoplasia maligna o historia.
- g) Desnutrición.

III.1.1.3.- Clasificación según severidad clínica.

Posterior al examen clínico y de laboratorio los pacientes fueron clasificados en tres grupos siguiendo los criterios de clasificación de dengue de la OMS (1997).

III.1.1.3.1.- Dengue Clásico, incluye a los pacientes con manifestaciones sistémicas leves como: fiebre, erupción maculopapular, dolor de cabeza severo, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, náuseas y vómitos.

III.1.1.3.2.- Dengue Hemorrágico, en este grupo se incluyeron aquellos pacientes que desarrollaban fiebre alta, hemorragia, hepatomegalia, insuficiencia circulatoria, trombocitopenia moderada o marcada con hemoconcentración concurrente, activación masiva del complemento y extravasación del plasma.

III.1.1.4.- Clasificación según el tipo de infección.

De acuerdo al tipo de infección los 70 pacientes con dengue fueron clasificados con: **Infección primaria (IP)** debido a la presencia o ausencia de anticuerpos IgM anti-dengue y/o título bajo ($<1:20$) de IgG anti-dengue específica e **Infección secundaria (IS)** por la detección de IgG anti-dengue a títulos elevados (4 veces o incluso títulos más altos entre suero en fase aguda y convaleciente) (Kao *et al.*, 2005; WHO, 1997).

III.1.1.5.- Clasificación de los casos de DH.

La severidad del DH se determinó de acuerdo a los criterios de la OMS (1997):

Grado I: fiebre acompañada por síntomas generales no específicos, y la única manifestación hemorrágica es una prueba de torniquete positiva.

Grado II: la misma sintomatología del grado I más sangrado espontáneo de cualquier localización.

Grado III: insuficiencia circulatoria que se manifiesta por pulso rápido y débil, tensión diferencial disminuida (20 mmHg o menos) o hipotensión; con piel fría y húmeda, y agitación.

Grado IV: choque profundo con presión arterial y pulso imperceptible.

III.1.2.- Grupo control.

III.1.2.1.- Controles sanos: Conformado por 10 individuos voluntarios sanos, con un rango de edad similar al grupo de pacientes seleccionados (5 - 60 años), sin antecedentes de infección durante las últimas 4 semanas para el

momento de la toma de la muestra y con resultados negativos a las pruebas virológicas y/o serológicas para DENV.

Para los cultivos de monocitos se incluyeron 10 individuos voluntarios de cada grupo seronegativos al virus, conformado por recién nacidos, adultos jóvenes y ancianos. En el caso de monocitos provenientes de neonatos, se tomó sangre del cordón umbilical al momento del parto.

Todos los pacientes o sus madres (en el caso de los neonatos) dieron su consentimiento para ser incluidos en esta investigación y el proyecto fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

III.2.- Toma de muestra.

Con el objeto de evaluar los mediadores inflamatorios durante la evolución de la enfermedad a cada paciente y controles, se les tomó una muestra sanguínea (5 ml) en la fase aguda (entre los 5 primeros días de la enfermedad), la cual se separó en 3 partes. Una parte se utilizó para aislamiento e identificación viral, otra para la determinación de los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue y la tercera (recolectada con anticoagulante) se utilizó para los estudios hematológicos: hematología completa (hemoglobina (Hb), hematocrito (HTO), conteo de blancos (CB) y conteo de plaquetas (CP).

Para la obtención de los monocitos de los pacientes con dengue y de los controles, se les extrajo sangre (20 ml) proveniente de cordón umbilical de recién nacidos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos en tubos con heparina sódica (Vacutainer®).

III.3.- Aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia Indirecta.

Las muestras de suero (150 µl) se sembraron en cultivos celulares de mosquitos *A. albopictus* C6/36. Al 5º día post-infección se retiró el sobrenadante del cultivo para su posterior uso, mientras que en las células se identificaron los antígenos a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) por el Método descrito por Tesh (1979) con anticuerpos monoclonales específicos de serotipo producidos en ratón y un anticuerpo secundario conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (anti-mouse IgG FITC, Sigma, St. Louis MO). Se utilizó para la visualización un microscopio invertido con fluorescencia modelo 872E (Carl Zeiss).

III.4.- Detección de anticuerpos específicos IgM e IgG anti-dengue.

Para la detección de inmunoglobulinas anti-dengue en suero, se utilizó la técnica de ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática) directo según el protocolo de trabajo del fabricante (Diagnostic Automation, Inc., Calabasas, USA). Se utilizaron micropozos cubiertos con antígeno de los 4 serotipos del DENV purificado de cultivo de células Vero. Durante la primera incubación con el suero de los pacientes (previamente diluido para el caso de IgG), los anticuerpos que son

reactivos con el antígeno se unen. Después de lavar, se añadió un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM humana conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante, según fuese el caso. Después de otra serie de lavados, se añadió un cromógeno-sustrato (tetrametilbencidina, o TMB-H₂O₂). La enzima conjugada catalizó una reacción que consumió el peróxido y convirtió el cromógeno de claro a azul. La adición de la solución de parada finalizó la reacción y convirtió el color azul a un color amarillo brillante, cuya intensidad fue proporcional a la concentración de anticuerpos presente en la muestra. La reacción fue leída a 450 nm con un lector de ELISA (BIORAD, USA). Las muestras se clasificaron en positivas y negativas, de acuerdo a los criterios de validación de la prueba.

III.5.- Líneas celulares y virus.

Las cepas de DENV (DENV-1 [Hawaii], DENV-2 [New Guinea C], DENV-3 [H-87] y DENV-4 [H-241]), se propagaron en células de mosquito C6/36, cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle con 10% de suero fetal bovino. El virus fue cosechado luego de una incubación de 5 días, removiéndose los detritos celulares por centrifugación y el sobrenadante con el virus se alicuotó y almacenó a -70°C hasta su utilización. Los títulos de infectividad se determinaron por la Técnica de Plaqueo de Bergold y Mazzali (1968) en células Vero. Las células se sembraron a una concentración de 2×10^6 células por pozo en placas de 24 pozos, posteriormente se añadieron diluciones seriadas del virus y la mezcla se incubó a 37°C por 7 días. Una vez que las placas fueron fijadas, se visualizaron con una solución 1% de cristal violeta. Las concentraciones del virus se expresaron en unidades formadoras de

placas por cada ml (UFP)/ml. El título viral utilizado en los ensayos fue de 4×10^3 UFP/ml. El sobrenadante contentivo del virus se encontró libre de endotoxina, lo que se determinó por el ensayo de lisado del *amebocyte Limulus* (LAL), Coamatic® Chromo-LAL assay (Chromogenix, AB, Sweden).

III.6.- Aislamiento y cultivo de monocitos.

Para la obtención de monocitos, se tomó sangre heparinizada proveniente de la vena umbilical de neonatos sanos a término, del sexo masculino, nacidos en el Hospital Materno-Infantil “Dr. Eduardo Soto Peña” y en la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza” (Maracaibo, Venezuela), y de sangre periférica de individuos del género masculino adultos jóvenes y ancianos. Para ello se utilizó centrifugación diferencial y formación de gradientes de densidad sobre una solución de Histopaque 1077® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Boyum, 1968; Katial *et al.*, 1998).

Las células mononucleares de sangre periférica fueron suspendidas en 1 ml de medio completo (medio RPMI 1640, con 10% de suero fetal bovino, 1000 U/ml de penicilina, 500 µg/ml de estreptomicina y 4 µg/ml de anfotericina B). Se verificó la viabilidad celular con la coloración supravital de azul tripán 0,4% y recuento en microscopio óptico en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). El porcentaje de células vivas se determinó por la capacidad de exclusión del colorante (las células muertas permeabilizan su membrana permiten la entrada del tripán tornándose de color azul). Las células viables (>de 95%) se ajustaron a una concentración de 2×10^6 cel/ml.

Para evaluar la existencia o no de daño causado por el DENV en los monocitos aislados de los pacientes, las suspensiones celulares tanto de los pacientes como de los controles se sembraron en placas de veinticuatro pozos plásticos de fondo plano con un diámetro de 16 mm y se incubaron por 1 y 3 días a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂. Las células no adherentes fueron removidas por lavados con medio de cultivo. Al remover las células se estimó una población de monocitos de aproximadamente 3X10⁵ cel/pozo (Peña *et al.*, 2007). Se determinó el grado de pureza de los monocitos utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano conjugado con FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Una parte de las monocapas homogéneas de monocitos fue estimulada con 50 ng/mL de LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Wittmann M *et al.*, 1999) transcurrido este tiempo, se recolectaron los sobrenadantes y se realizaron los lisados celulares para la determinación de citoquinas, antioxidantes y radicales libres. Otro grupo de células fueron fijadas con formalina al 10% para la detección de apoptosis.

Para la determinación de CAT, SOD y GSH, los monocitos fueron lisados por sonicación utilizando buffer frío, se centrifugaron a 600 xg por 10 minutos, para luego ser medidos en el sobrenadante.

Con la finalidad de analizar el impacto sobre el sistema inmunitario-inflamatorio del DENV, se midió el resultado de la inoculación del virus sobre la inducción de apoptosis *in vitro* en células mononucleares cultivadas de sujetos normales, Para ello se utilizaron monocapas obtenidas del grupo control que fueron

infectadas con suspensiones de cultivo viral de cepas de referencia (DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (New Guinea C), DENV-3 (H-87) y DENV-4 (H-241) (Lanciotti *et al*, 1992), a una concentración de 4×10^3 UFP/ml (MOI:1). En este ensayo se incluyeron monocitos control, que se cultivaron con medio suplementado sin virus (Espina *et al*., 2003). Utilizando la técnica de IFI descrita previamente se confirmó la infección viral de los monocitos y se determinó apoptosis al 1^{ro} y 3^{er} día PI.

III.7.- Determinación de citoquinas en el suero y en sobrenadantes de cultivo de monocitos.

El sobrenadante de cultivo de monocitos se utilizó para la determinación de varias citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL1- β e IL-6), cuya producción se relacionó con la activación de los mismos inducida por la infección con DENV. Se cuantificó utilizando un kit comercial de ELISA proporcionado por la casa comercial R&D Systems (Minneapolis, MN. USA). La cantidad de citoquina se expresó como pg/mg de proteína.

III.7.1.- Cuantificación de TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

La técnica consistió en un ELISA cuantitativo tipo sándwich, donde se hizo reaccionar las muestras y controles con un anticuerpo monoclonal de captura específico para cada citoquina a ensayar, fijado en la fase sólida de micropozos, sobre la cual se agregó un anticuerpo monoclonal biotinilado. Luego de un periodo de incubación y lavado se le agregó un complejo de estreptavidina-peroxidasa que

se unió al anticuerpo biotinilado. Posterior al periodo de incubación y lavado, se agregó el sustrato TMB. La reacción enzimática-sustrato se evidenció por el desarrollo de un color cuya intensidad fue directamente proporcional a la concentración de la citoquina presente en la muestra. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas y que se incluyen simultáneamente al procesamiento de las muestras. Los resultados fueron expresados en pg/ml. La concentración mínima detectable por el ensayo de TNF- α , IL-1 β e IL-6 fue de 2, 1 y 1 pg/ml, respectivamente.

III.8.- Determinación de proteínas del complemento en el suero de pacientes infectados por el virus dengue.

La determinación de las proteínas del complemento C3 y C4 se realizó por nefelometría, utilizando el Kit diagnóstico MininephTM Human (Birmingham, UK). La determinación de la concentración sérica de antígeno soluble por métodos nefelométricos involucró una reacción con el anticuerpo unido a una partícula látex para formar complejos insolubles. Cuando la luz pasó a través de la suspensión formada, una porción de la luz fue dispersada y detectada por un fotodiodo. La cantidad de luz dispersada fue directamente proporcional a la concentración de la proteína específica en la muestra analizada. Las concentraciones fueron calculadas automáticamente por referencia de una curva de calibración almacenada en el instrumento. Los valores se expresaron en mg/L.

III.9.- Determinación de Proteína C Reactiva (PCR) en el suero de pacientes infectados por el virus dengue.

Para la cuantificación de la PCR en suero, se empleó la Técnica de ELISA, según el protocolo de trabajo de la casa comercial Hemagen Diagnostics, Inc. (Columbia, USA). En este inmunoensayo, la placa estaba recubierta por anticuerpos de cabra anti-PCR humana. Las muestras que contenían PCR reaccionaron específicamente con los anticuerpos inmovilizados que cubren el pozo de la placa. Después de la incubación se removió el exceso ocasional de antígeno. Se adicionó el anticuerpo secundario de conejo anti-PCR humana conjugado con peroxidasa de rábano, el cual se unió a la PCR capturada en el primer paso. Luego la placa fue lavada para remover los anticuerpos no unidos. La presencia del conjugado se determinó a través de la acción de la enzima peroxidasa sobre el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detuvo por la adición de ácido sulfúrico y la placa fue leída a 450 nm. La cantidad de sustrato a su vez se determinó colorimétricamente por la medida de la absorbancia la cual fue proporcional a la concentración de PCR presente en la muestra. Los valores se expresaron en µg/ml.

III.10.- Determinación de la actividad de enzimas y metabolitos oxidativos (CAT, SOD, GSH, NO, MDA) en lisados celulares y sobrenadantes de cultivo de monocitos.

III.10.1.- Determinación de actividad de catalasa (CAT).

La actividad de la catalasa en el lisado de monocitos, se determinó utilizando un kit comercial (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), el cual utilizó la función de peroxidación de la catalasa para determinar la actividad enzimática. El método se basó en la reacción de la enzima con el metanol en presencia de una concentración óptima de H_2O_2 . El formaldehído producido se midió colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como el cromógeno. El Purpald formó específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, el cual una vez oxidado cambió de incoloro a púrpura. Los resultados se expresaron como nmol/min/mg de proteína.

III.10.2.- Determinación de actividad de superóxido dismutasa (SOD).

La actividad de la SOD en el lisado de monocitos se midió a través del uso de un kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). El kit utilizó una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para exponer 50% de dismutación del radical superóxido. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

III.10.3.- Determinación de glutatión reducido (GSH).

El contenido de GSH se determinó a través de un kit comercial (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), utilizando lisados celulares. Se basó en un método cuidadosamente optimizado de reciclaje enzimático, utilizando glutatión reductasa para la cuantificación de GSH. El grupo sulfhidrilo del GSH reaccionó con DTNB (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico ácido, el reactivo de Ellman) y produjo un color amarillo 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). La mezcla de disulfuro, GSTNB (entre GSH y TNB) que se produjo de forma concomitante, se redujo a glutatión reductasa para reciclar el GSH y producir más TNB. La tasa de producción de TNB fue directamente proporcional a la reacción de reciclaje que a su vez fue directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. La medición de la absorbancia de TNB a 405 o 412 nm proporcionó una estimación precisa de GSH en la muestra. Los resultados se expresaron como $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

III.10.4.- Determinación de Oxido Nítrico (NO).

La formación de NO se determinó a partir de la detección de nitritos/nitratos en el suero de los pacientes con dengue y en los sobrenadantes de los cultivos de monocitos infectados con los diferentes serotipos del virus, recolectados al 1ro, 3ro y 5to día después de la infección, y evaluados con el kit de análisis de Oxido Nítrico QuantichromTM de la casa comercial Bioassay Systems (Hayward, USA). La determinación de NO se basó en la Reacción de Griess. La prueba se fundamenta en que la adición de nitritos y ácido sulfanílico interactúa con N-(1-naftil)-

etilendiamina, generando un producto que es fácilmente monitoreado por espectrofotometría a 550 nm. Los valores fueron expresados en μM en suero y en los cultivos se expresaron en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

III.10.5.- Determinación de Malondialdehído (MDA).

El contenido de MDA (un producto de la hidrólisis de hidroperóxidos de lípidos) se determinó a través del ensayo con ácido tiobarbitúrico (NWLSSTM Malondialdehyde Assay, Vancouver, WA), en lisados celulares. A un volumen del sobrenadante se adicionó un volumen de una solución que contiene 8,1% SDS, 20% de ácido acético y 0,8% de ácido tiobarbitúrico, pH 3,5. La mezcla completa se calentó a 95°C por 60 minutos, luego el sustrato cromogénico fue extraído hacia la fase orgánica con butanol/piridina (15:1). La absorbancia de la capa orgánica se midió a 532 nm. Se utilizó como estándar externo el MDA bis-dimetil acetato y los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

III.11.- Determinación de proteínas.

La determinación de las proteínas se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), basado en la unión del colorante Comassie blue G-250 a las proteínas. Éstas fueron medidas en los monocitos que quedaron adheridos en el fondo de la placa, los cuales se sometieron a un proceso de sonicación para romper la pared celular. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de

regresión lineal de densidad óptica vs. concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas de albumina y que se incluyeron simultaneo al procesamiento de las muestras. Los resultados se leyeron a 595 nm y fueron expresados en mg.

III.12.- Detección de apoptosis.

Se realizó la técnica de TUNEL, utilizando el kit de detección de Apoptosis por fluorescencia (ApopTag® In Situ, Chemicon International, USA & Canadá) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basó en el marcaje de los extremos 3'-OH libres del ADN fragmentado con nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción de la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT). Esta enzima catalizó la adición de los nucleótidos trifosfato a la extremos 3'-OH terminales del ADN. Los nucleótidos incorporados formaron un oligómero compuesto por nucleótidos digoxigenina y nucleótidos no marcados en una secuencia aleatoria. Los fragmentos de ADN marcados con los dNTP se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugada con FITC. Este sistema biológico-histoquímico molecular permitió teñir específicamente de los extremos 3'-OH terminales los cuales son localizados en los cuerpos apoptóticos. Se agregó medio de montaje (DAPI) y los núcleos apoptóticos positivos fueron visualizados usando un microscopio de epifluorescencia (Axioskop, Zeiss, Germany). Los cultivos de monocitos se estudiaron a los 1 y 3 días post – infección. La presencia de apoptosis se reportó como % de células TUNEL (+)/total de 100 células.

III.13.- Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos se representan como promedios \pm desviación estándar (DE) y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de comparaciones múltiples (post-test) de Bonferroni, según el caso. El criterio para la significancia estadística fue $p < 0,05$. Para todos los análisis se utilizó el programa Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, C.A., USA).

IV. RESULTADOS

IV.1.- Datos Clínicos.

Se estudiaron 70 pacientes con infección activa por el virus dengue confirmados serológicamente, de los cuales 36 (51,43%) presentaron DC (20 con infección primaria y 16 con infección secundaria), mientras que 34 (48,57%) cursaron con DH, de los cuales 14 (20%) eran Grado I (7 con infección primaria y 7 con infección secundaria) y 20 (28,57%) Grado II (11 con infección primaria y 9 con infección secundaria). Se incluyeron 10 individuos controles (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los pacientes con dengue de acuerdo al curso clínico y tipo de respuesta inmunitaria.

	Tipo de Infección	
	Primaria	Secundaria
Dengue Clásico (n=36)	20	16
Dengue Hemorrágico (n=34)		
Grado I (n=14)	7	7
Grado II (n=20)	11	9
Controles (n=10)	-	-

Casos de pacientes con infección aguda por virus dengue (n=70) con un 87,5 % de positividad para anticuerpos tipo IgM anti-dengue y 81,25% para IgG anti-Dengue (ELISA directo) y clasificados según la severidad de la enfermedad y tipo de infección de acuerdo a los criterios de la OMS (1997). Los controles fueron individuos aparentemente sanos.

Con respecto al diagnóstico virológico, se encontró que 30 (42,86%) fueron infecciones debidas a DENV-2, 20 (28,57%) casos de DENV-3 y 20 (28,57%) de DENV-4. No se identificaron casos de DENV-1.

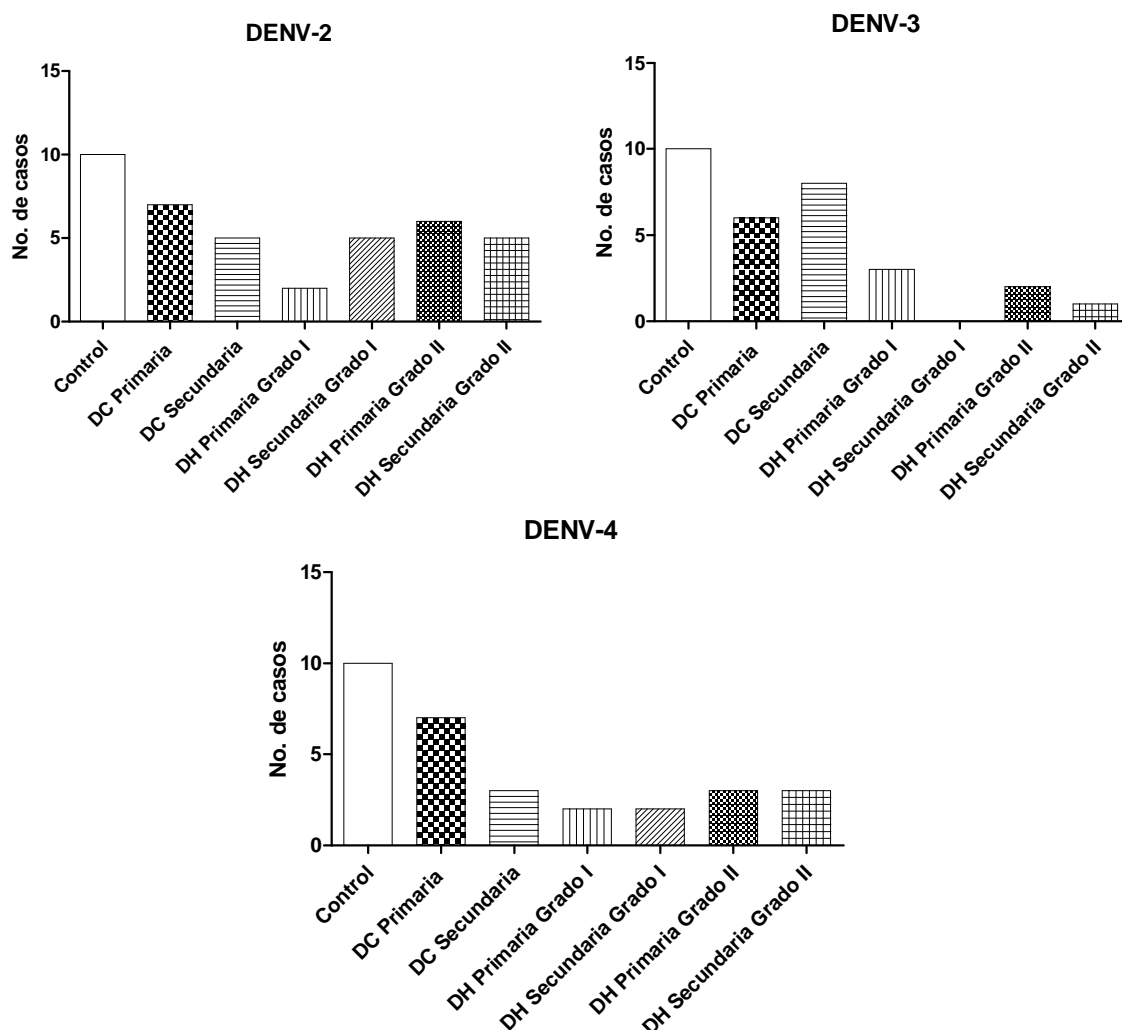


Figura 1. Casos de pacientes con infección aguda por virus dengue, de acuerdo a la severidad, grados de afectación y tipo de infección en relación al serotipo viral infectante. Pacientes con infección aguda por virus dengue (n=70), clasificados según la severidad de la enfermedad y tipo de infección de acuerdo a los criterios de la OMS (1997). Los controles fueron individuos aparentemente sanos.

Al clasificar los pacientes de acuerdo a la severidad de la enfermedad, grados de afectación y tipo de infección en relación al serotipo viral del dengue, se evidenció que los infectados por DENV- 2, 7 desarrollaban DC primaria, 5 DC secundaria, 2 DH primaria Grado I, 5 DH secundaria Grado I, 6 DH Primaria Grado II y 5 DH

Secundaria Grado II. Los pacientes infectados con el serotipo 3 presentaron DC primaria (6 casos), DC secundaria (8 casos), DH primaria Grado I (3 casos), DH Primaria Grado II (2 casos) y DH Secundaria Grado II (1 caso). Mientras que los infectados con DENV-4 presentaron DC primaria (7 casos), DC secundaria (3 casos), DH primaria Grado I (2 casos), DH secundaria Grado I (2 casos), DH Primaria Grado II (3 casos) y DH Secundaria Grado II (3 casos) (Figura 1).

Los hallazgos hematológicos de los pacientes revelaron: Hemoglobina (g/dl), $12,46 \pm 1,50$ en DC y $12,65 \pm 2,23$ en DH; Hematocrito (%), $40,07 \pm 5,63$ en DC y $41,41 \pm 6,95$ en DH; Leucocitos/mm³, 3769 ± 1528 en DC y 3937 ± 1586 en DH; Plaquetas/mm³, $136,9 \pm 16,09$ en DC y $75,09 \pm 27,95$ en DH.

IV.2.- Determinación de mediadores inflamatorios en pacientes con infección aguda por virus dengue.

En el presente estudio se evaluaron los niveles circulantes de los mediadores inflamatorios TNF- α , IL-6, IL1 β , C3, C4, PCR y NO. Se estudió esta respuesta sistémica durante la infección viral considerando la fase aguda de la enfermedad, severidad de afectación (DC y DH), tipo de infección (IP e IS) y serotipo viral infectante (DENV 2, 3, 4).

IV.2.1.- Determinación sérica de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β).

IV.2.1.1.- Citoquinas proinflamatorias según severidad de afectación y tipo de infección.

El aumento significativo de IL-6 asociado a los casos de dengue hemorrágico fue el hallazgo principal, al relacionar las concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias con la severidad y tipo de infección por virus dengue.

Las concentraciones séricas de TNF- α se elevaron ($p < 0,001$) en los casos activos de dengue (DC= $87,8 \pm 6,268$ pg/ml y DH= $95,35 \pm 9,998$ pg/ml) con respecto a la población control ($13,18 \pm 1,298$ pg/ml). En relación al tipo de infección (primaria y secundaria) se observaron diferencias en las mismas ($p < 0,001$) (IP= $85,16 \pm 2,973$ pg/ml e IS= $90,65 \pm 10,71$ pg/ml) cuando se compararon con la población control (Figura 2A).

En cuanto a las concentraciones de IL-6 obtenidas en el suero de pacientes con infección activa por virus dengue se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los grupos con dengue (DC= $3,091 \pm 0,9533$ pg/ml; DH= $4,468 \pm 1,657$ pg/ml) con respecto al control ($0,5661 \pm 0,1178$ pg/ml) y entre DC y DH ($p < 0,001$). De acuerdo al tipo de infección, se evidenció incremento ($p < 0,001$) en todos los grupos (IP= $3,500 \pm 1,125$ pg/ml; IS= $4,062 \pm 1,819$ pg/ml) con respecto al control, no así entre ellos (Figura 2B).

En relación a las concentraciones séricas de IL-1 β , no se observaron cambios significativos entre los casos activos por virus dengue relacionados con la severidad de la enfermedad (DC= 6,745 \pm 1,167 pg/ml y DH= 7,372 \pm 1,646 pg/ml), ni al compararlos con el control (7,042 \pm 1,248 pg/ml). En cuanto al tipo de infección (IP= 6,909 \pm 1,236 pg/ml y IS= 7,137 \pm 1,687 pg/ml) no se observaron cambios importantes en la concentración de esta citoquina en relación al control (Figura 2C).

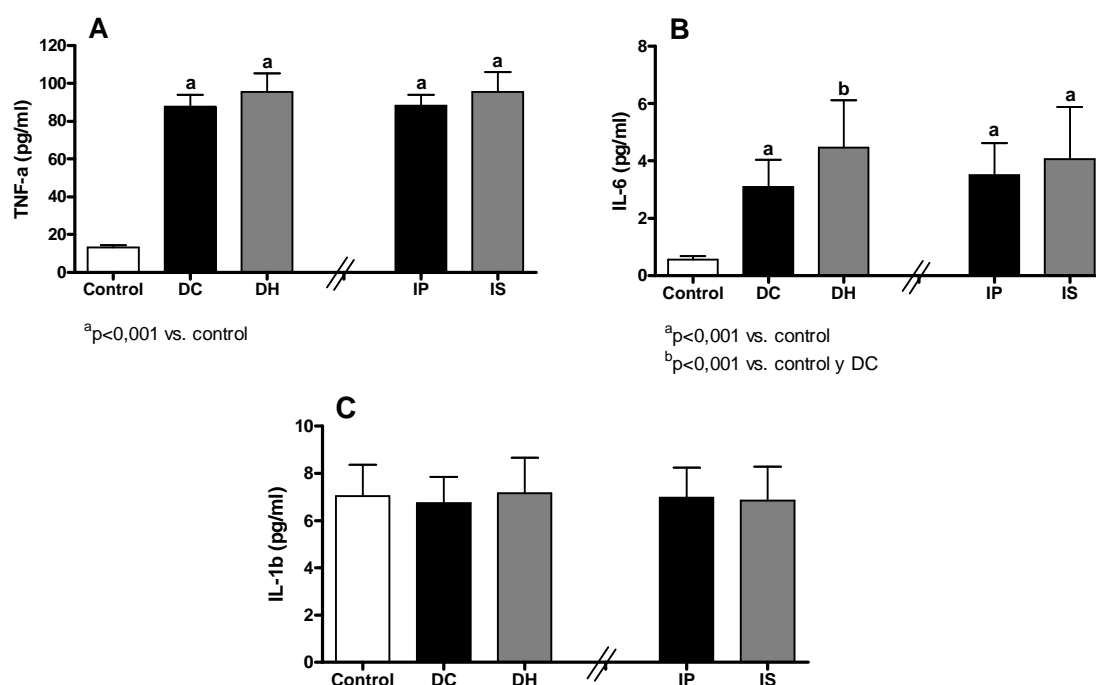


Figura 2. Concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al tipo de infección y severidad de la enfermedad. Las concentraciones de las citoquinas se determinaron por la técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.1.2.- Citoquinas proinflamatorias según severidad, grados de afectación y tipo de infección.

Al analizar las concentraciones séricas de las citoquinas proinflamatorias de acuerdo al tipo de infección, severidad y grados de afectación de la enfermedad, se objetivó un incremento importante de TNF- α e IL-6, no así de IL-1 β en los pacientes con DH con infección secundaria grado II.

Las concentraciones séricas de TNF- α se encontraron significativamente aumentadas ($p < 0,001$) en todos los grupos estudiados (DC primaria= $87,53 \pm 7,033$ pg/ml; DC secundaria= $88,12 \pm 5,366$ pg/ml; DH primaria Grado I= $89,45 \pm 4,258$ pg/ml; DH secundaria Grado I= $96,36 \pm 3,622$ pg/ml; DH primaria Grado II= $87,71 \pm 4,147$ pg/ml y DH secundaria Grado II= $108,5 \pm 7,875$ pg/ml) con respecto al control ($13,18 \pm 1,298$ pg/ml). Además, se incrementó ($p < 0,01$) el grupo de DH secundaria Grado II con respecto al resto de los grupos estudiados (Figura 3A).

Al relacionar la IL-6 con el tipo de infección y la severidad de la enfermedad, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los grupos de DC primaria ($3,092 \pm 0,9520$ pg/ml), DC secundaria ($3,090 \pm 0,9861$ pg/ml), DH primaria Grado I ($3,049 \pm 0,5282$ pg/ml), DH secundaria Grado I ($3,481 \pm 1,381$ pg/ml), DH primaria Grado II ($4,529 \pm 1,073$ pg/ml) y DH secundaria Grado II ($6,266 \pm 1,410$ pg/ml) con respecto a la población control ($0,5661 \pm 0,1178$ pg/ml). Así mismo, se evidenció incremento significativo ($p < 0,01$) entre DH secundaria Grado II con el resto de los grupos (Figura 3B).

Se observó un patrón similar de las concentraciones séricas de IL-1 β en los grupos analizados al relacionarlas con el tipo de infección y severidad de la enfermedad (Control= 7,042 \pm 1,248 pg/ml; DC primaria= 6,662 \pm 0,8355 pg/ml; DC secundaria= 6,692 \pm 1,514 pg/ml; DH primaria Grado I= 6,476 \pm 0,7819 pg/ml; DH secundaria Grado I= 7,766 \pm 1,501 pg/ml; DH primaria Grado II= 7,635 \pm 1,768 pg/ml y DH secundaria Grado II= 7,440 \pm 2,046 pg/ml) (Figura 3C).

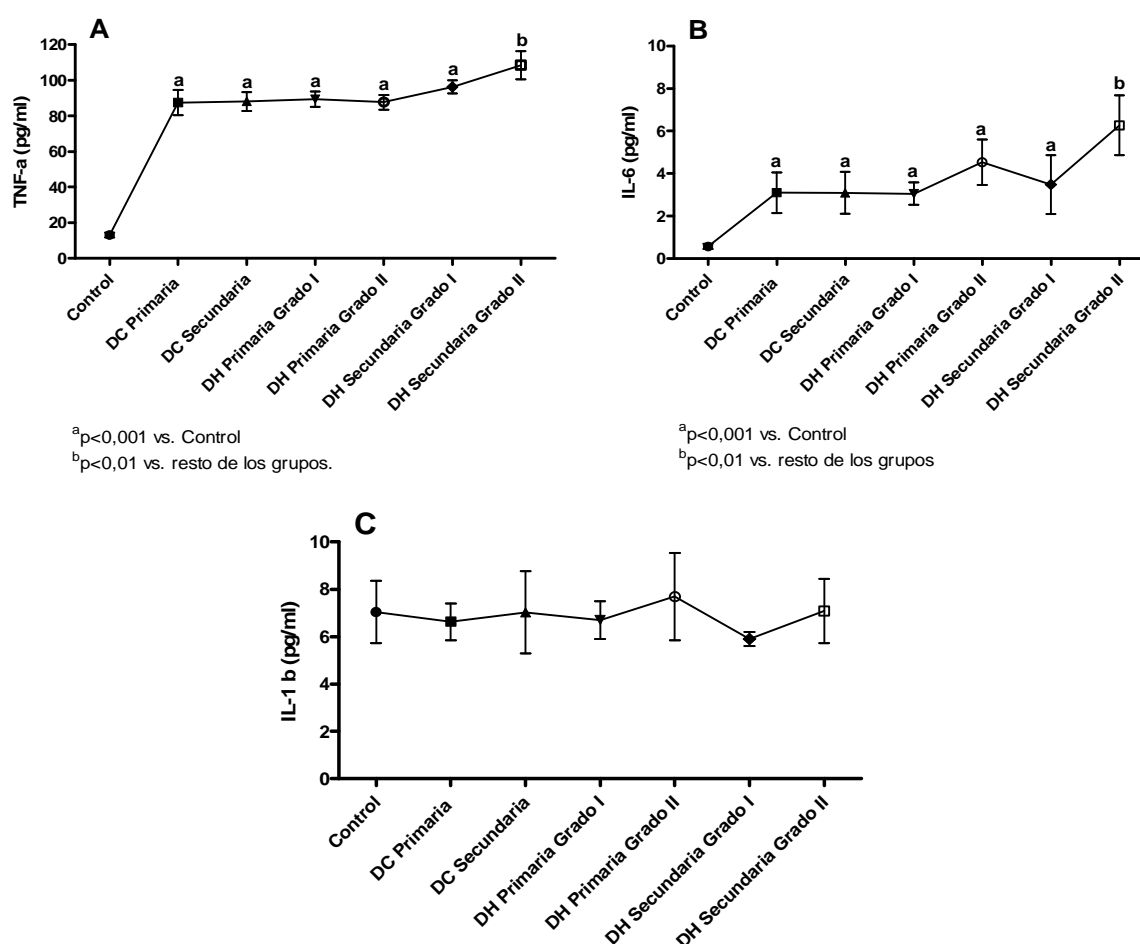


Figura 3. Concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas a la severidad, grados de afectación y tipo de infección. Las concentraciones de las citoquinas se determinaron por la técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.1.3.- Citoquinas proinflamatorias según el serotipo viral infectante.

Al analizar las concentraciones séricas del TNF- α , IL-6 e IL-1 β de acuerdo al serotipo viral infectante, fue evidente un aumento de TNF- α e IL-6 en los pacientes con infección aguda por virus dengue causada por los serotipos DENV-2, DENV-3 y DENV-4, y en el caso de IL-6 este aumento fue marcadamente asociado a DENV-4.

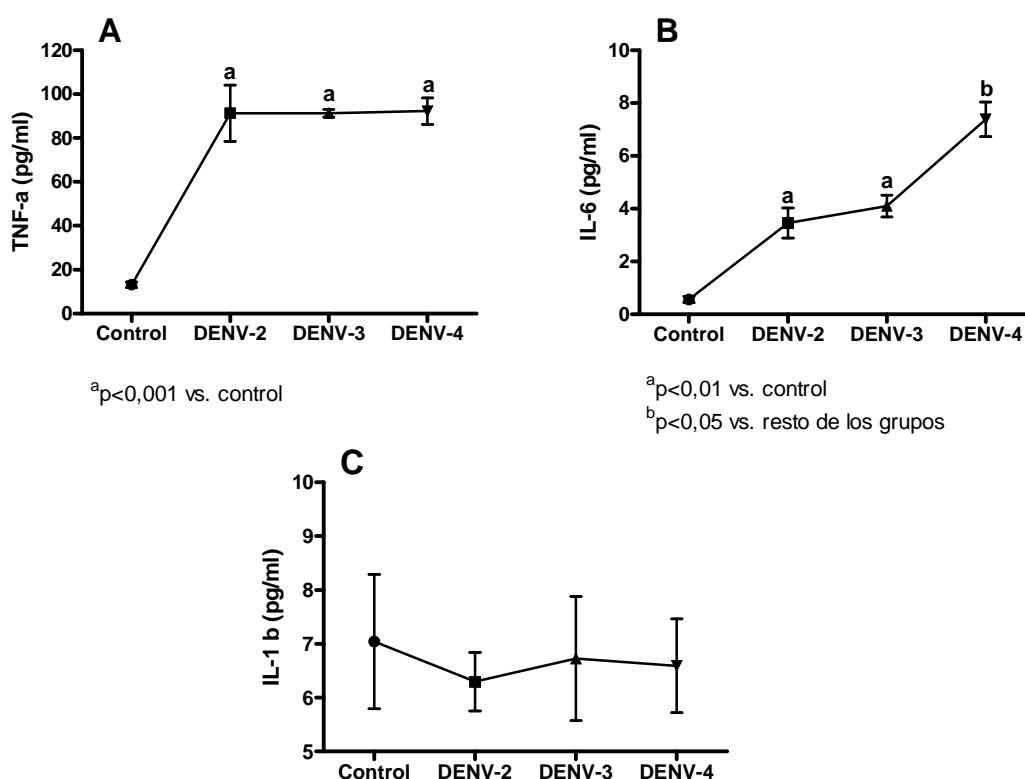


Figura 4. Concentraciones séricas de citoquinas proinflamatorias en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al serotipo viral infectante. Las concentraciones de las citoquinas se determinaron por la técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Al evaluar las concentraciones séricas del TNF- α de acuerdo al serotipo viral infectante, se mostraron diferencias significativas al comparar los serotipos de dengue (DENV-2= 91,31 \pm 12,87 pg/ml; DENV-3= 91,3 \pm 1,77 pg/ml y DENV-4= 92,24 \pm 6,102 pg/ml) con el grupo control (13,18 \pm 1,298 pg/ml), no así entre ellos (Figura 4A).

De igual manera, las concentraciones séricas del IL-6 mostraron diferencias significativas al comparar los serotipos del virus (DENV-2= 3,46 \pm 0,56 pg/ml; DENV-3= 4,1 \pm 0,41 pg/ml y DENV-4= 7,387 \pm 0,6 pg/ml) con el grupo control (0,5661 \pm 0,1178 pg/ml). Así mismo se incrementó en los pacientes infectados con el serotipo 4 en relación al resto de los serotipos (Figura 4B).

No hubo asociación entre las concentraciones de IL-1 β con respecto al serotipo viral infectante (Figura 4C).

IV.2.2.- Determinación sérica de proteínas del complemento (C3 y C4).

IV.2.2.1.- Proteínas del Complemento según severidad de afectación y tipo de infección.

En relación a la proteína C3 del complemento, se encontró disminución ($p < 0,001$) de la concentración, tanto en los casos activos de DC (0,9222 \pm 0,2544 g/L) y DH (0,6435 \pm 0,1544 g/L) con respecto al control (1,263 \pm 0,3025 g/L); y esta disminución fue más acentuada ($p < 0,001$) en DH con respecto a DC. Así mismo, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos estudiados de acuerdo

al tipo de infección (IP= $0,9435 \pm 0,2337$ g/L y IS= $0,8959 \pm 0,2837$ g/L) en relación al control, no así entre los grupos de IP e IS (Figura 5A).

Las concentraciones séricas de la proteína C4 del complemento, no evidenciaron cambios significativos (Control= $0,2816 \pm 0,0806$ g/L; DC= $0,3263 \pm 0,0526$ g/L; DH= $0,2860 \pm 0,0895$ g/L; IP= $0,3050 \pm 0,0645$ g/L; IS= $0,3088 \pm 0,0872$ g/L) al evaluarlas según la severidad de la enfermedad y el tipo de infección (Figura 5B).

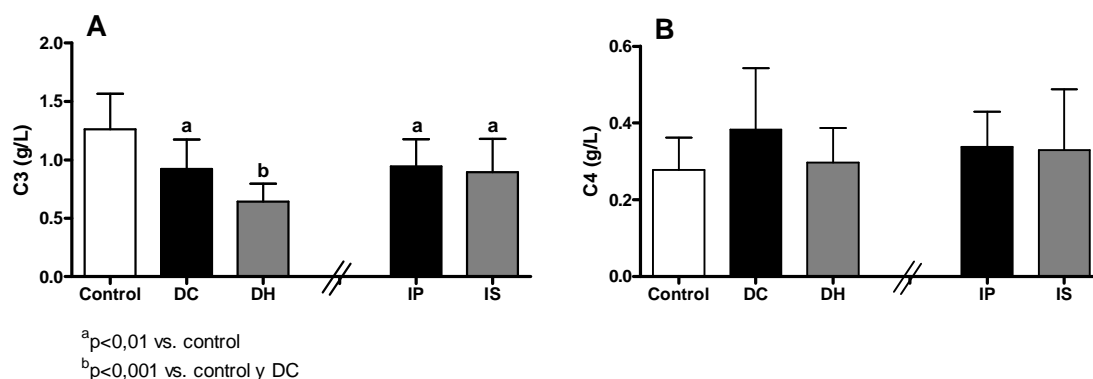


Figura 5. Concentraciones séricas de proteínas del complemento en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al tipo de infección y severidad de la enfermedad. Las concentraciones de las proteínas del complemento se determinaron por Nefelometría en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $X \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.2.2.- Proteínas del Complemento según severidad, grados de afectación y tipo de infección.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos de DC primaria ($0,9435 \pm 0,2337$ g/L), DC secundaria ($0,8956 \pm 0,2837$ g/L), DH primaria Grado I ($0,8286 \pm 0,04845$ g/L), DC secundaria Grado I ($0,6714 \pm 0,1277$ g/L), DH primaria Grado II ($0,6609 \pm 0,1005$ g/L) y DC secundaria Grado II ($0,4567 \pm 0,03708$ g/L) con respecto al control ($1,263 \pm 0,3025$ g/L) en las concentraciones séricas de C3 y una $p < 0,05$ entre DH secundaria Grado II con DC primaria, DC secundaria y DH primaria Grado I (Figura 6A).

Solo se evidenció incremento significativo ($p < 0,01$) en las concentraciones séricas de C4 en pacientes con infección aguda por DENV que presentaron DC secundaria ($0,3450 \pm 0,0624$ g/L) con respecto a DH secundaria Grado II ($0,2337 \pm 0,0925$ g/L) (Figuras 6B).

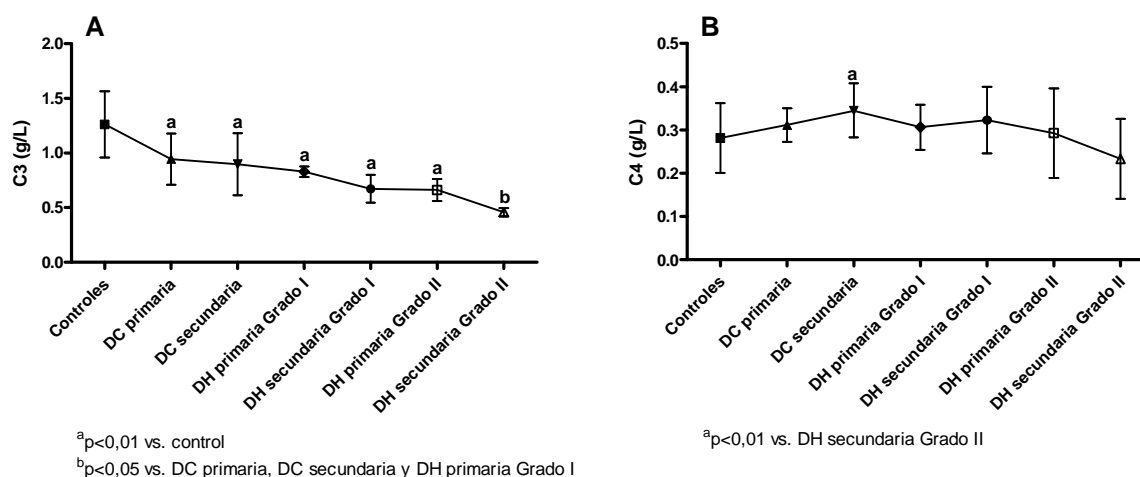


Figura 6. Concentraciones séricas de proteínas del complemento en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas a la severidad, grados de afectación y tipo de infección. Las concentraciones de las proteínas del complemento se determinaron por Nefelometría en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.2.3.- Proteínas del Complemento según el serotipo viral infectante.

Las concentraciones séricas de C3 observadas en los pacientes infectados por el serotipo DENV-3 ($1,105 \pm 0,3047$ g/L) fueron significativamente altas ($p < 0,05$) con respecto a los infectados por DENV-2 (Figura 7A).

De igual forma, se evidenció incremento ($p < 0,05$) en las concentraciones séricas de C4 en pacientes con infección activa por DENV-3 ($0,4220 \pm 0,1578$ g/L) al compararlos con los que presentaban el serotipo DENV-2 ($0,2503 \pm 0,0467$ g/L) (Figura 7B).

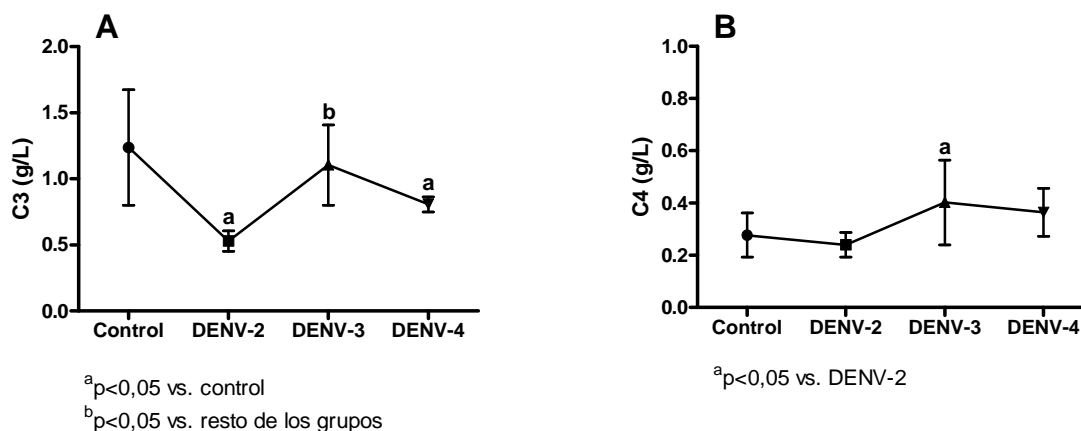


Figura 7. Concentraciones séricas de proteínas del complemento en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al serotipo viral infectante. Las concentraciones de las proteínas del complemento se determinaron por Nefelometría en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.3.- Determinación sérica de Proteína C Reactiva (PCR).

IV.2.3.1.- Proteína C Reactiva según severidad de afectación y tipo de infección.

Al analizar las concentraciones séricas de PCR en pacientes con infección activa por dengue y relacionándolas con la severidad de afectación y tipo de infección, se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) al comparar los pacientes con DH ($7,810 \pm 4,525 \mu\text{g/ml}$) con el grupo control ($2,916 \pm 0,7998 \mu\text{g/ml}$) y DC ($4,623 \pm 2,148 \mu\text{g/ml}$). También se observaron diferencias ($p < 0,001$) en las concentraciones de PCR entre los pacientes que presentaron IS ($8,675 \pm 4,008 \mu\text{g/ml}$) con respecto al control e IP ($4,063 \pm 1,994 \mu\text{g/ml}$) (Figura 8).

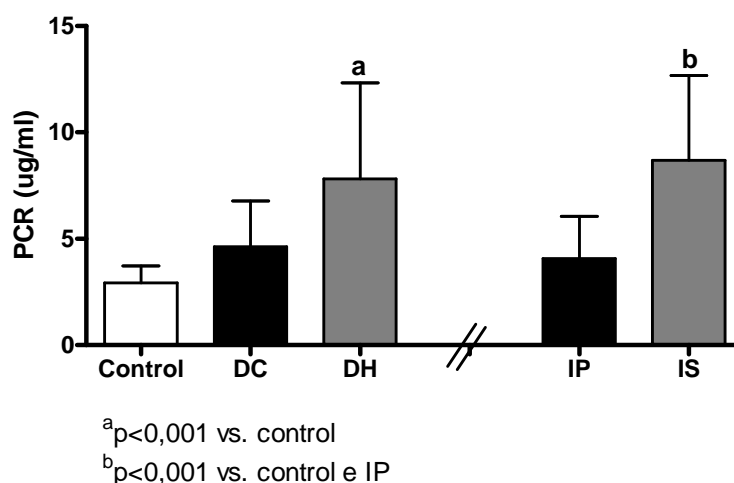


Figura 8. Concentraciones séricas de proteínas c reactiva en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al tipo de infección y severidad de la enfermedad. Las concentraciones de la proteína c reactiva se determinaron por la Técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.3.2.- Proteínas C Reactiva según severidad, grados de afectación y tipo de infección.

Se observó que las concentraciones de PCR en el suero de los pacientes, de acuerdo a la severidad y grados de afectación del dengue, hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos con DC secundaria ($5,298 \pm 2,527 \mu\text{g/ml}$); DH secundaria Grado I ($15,35 \pm 2,287 \mu\text{g/ml}$); DH primaria Grado II ($4,016 \pm 1,426 \mu\text{g/ml}$); DH secundaria Grado II ($6,415 \pm 1,482 \mu\text{g/ml}$) con respecto al control ($2,916 \pm 0,7998 \mu\text{g/ml}$), DC primaria ($3,149 \pm 0,5923 \mu\text{g/ml}$) y DH primaria Grado I ($10,88 \pm 1,072 \mu\text{g/ml}$), y un incremento significativo ($p < 0,001$) en las concentraciones en pacientes con DH secundaria Grado II con respecto al resto de los grupos estudiados (Figura 9).

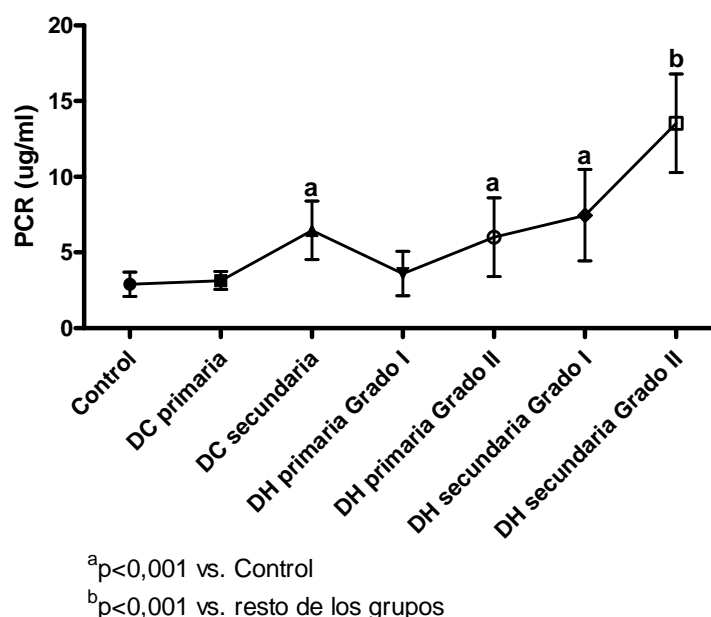


Figura 9. Concentraciones séricas de proteína c reactiva en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas a la severidad, grados de afectación y tipo de infección. Las concentraciones de la proteína c reactiva se determinaron por la técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $X \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.3.3.- Proteína C Reactiva según el serotipo viral infectante.

En cuanto al serotipo viral infectante en el suero de los pacientes, se observó elevación ($p < 0,05$) en las concentraciones de PCR cuando los serotipos infectantes fueron DENV-2 ($14,53 \pm 2,218 \mu\text{g/ml}$), DENV-3 ($6,709 \pm 2,608 \mu\text{g/ml}$) y DENV-4 ($8,690 \pm 1,999 \mu\text{g/ml}$) con respecto al control ($2,916 \pm 0,799 \mu\text{g/ml}$). De igual manera, se encontró que las concentraciones de PCR en los pacientes infectados por el serotipo DENV-2 fueron significativamente altas ($p < 0,001$) con respecto a los infectados por DENV-3 y DENV-4 (Figura 10).

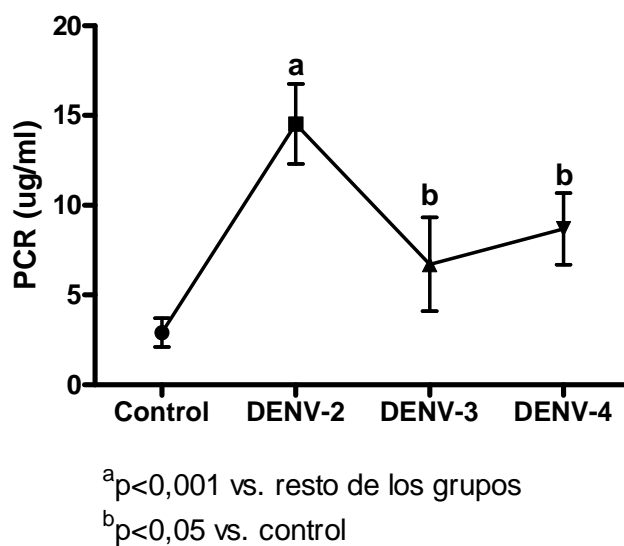


Figura 10. Concentraciones séricas de proteína c reactiva en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al serotipo viral infectante. Las concentraciones de la proteína c reactiva se determinaron por la Técnica de ELISA en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.4.- Determinación sérica de Oxido Nítrico (NO).

IV.2.4.1.- Oxido Nítrico según severidad de afectación y tipo de infección.

Se observaron concentraciones de NO incrementadas ($p < 0,001$) en el suero de pacientes con dengue (DC: $41,73 \pm 9,514 \mu\text{M}$; DH: $22,92 \pm 9,857 \mu\text{M}$) con relación al control ($3,942 \pm 2,317 \mu\text{M}$), mayor ($p < 0,001$) en DC con respecto a DH. Al analizar las concentraciones según el tipo de infección, se demuestran diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre la IP ($26,21 \pm 11,74 \mu\text{M}$) e IS ($40,18 \pm 11,46 \mu\text{M}$) con respecto al grupo control y entre ellas ($p < 0,001$) (Figura 11).

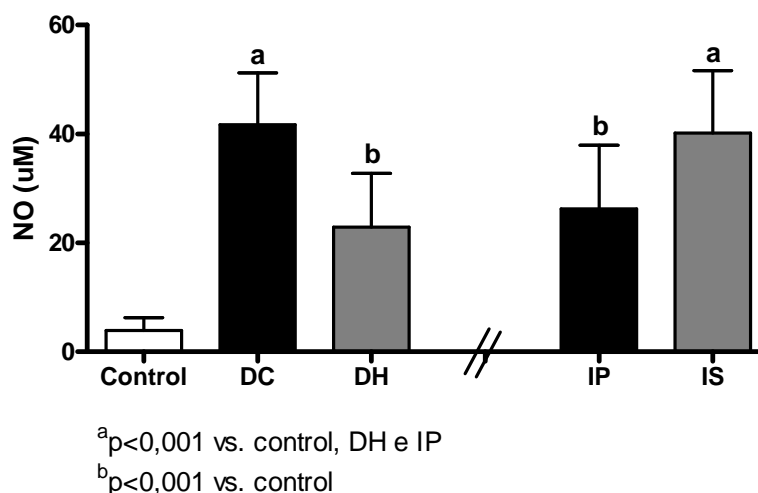


Figura 11. Concentraciones séricas de NO en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al tipo de infección y severidad de la enfermedad. Las concentraciones de óxido nítrico se determinaron mediante un ensayo de diazotización basado en la reacción de Griess en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.4.2.- Óxido Nítrico según severidad, grados de afectación y tipo de infección.

Con respecto a las concentraciones séricas de NO de acuerdo a la severidad de la enfermedad, grados de afectación y tipo de infección, se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,001$) al comparar los pacientes con DC primaria ($35,47 \pm 7,565 \mu\text{M}$), DC secundaria ($49,55 \pm 4,604 \mu\text{M}$), DH primaria Grado I ($12,11 \pm 0,9467 \mu\text{M}$), DH secundaria Grado I ($23,52 \pm 5,949 \mu\text{M}$), DH primaria Grado II ($18,32 \pm 4,638 \mu\text{M}$) y DH secundaria Grado II ($36,46 \pm 2,986 \mu\text{M}$) con el grupo control ($3,942 \pm 2,317 \mu\text{M}$). También se observaron diferencias ($p < 0,05$) en pacientes con DC secundaria al compararlos con el resto de los grupos estudiados (Figura 12).

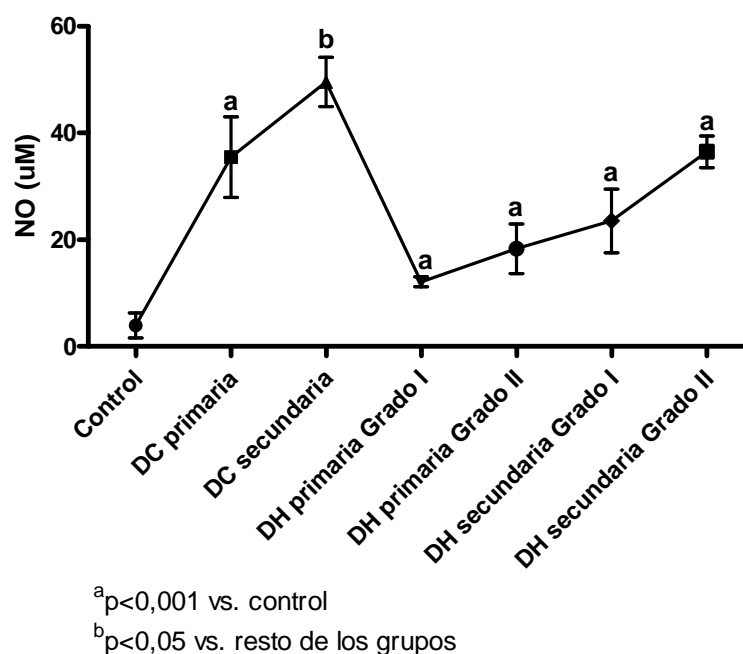


Figura 12. Concentraciones séricas de NO en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas a la severidad y grados de afectación. Las concentraciones de óxido nítrico se determinaron mediante un ensayo de diazotización basado en la reacción de Griess en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.2.4.3.- Óxido Nítrico según el serotipo viral infectante.

En cuanto al serotipo viral infectante en el suero de los pacientes, se observó incremento ($p < 0,001$) en las concentraciones de NO en los serotipos infectantes DENV-2 ($15,08 \pm 2,59 \mu\text{M}$), DENV-3 ($11,76 \pm 1,89 \mu\text{M}$) y DENV-4 ($16,12 \pm 2,25 \mu\text{M}$) con respecto al control ($3,942 \pm 2,317 \mu\text{M}$), sin diferencias entre ellos (Figura 13).

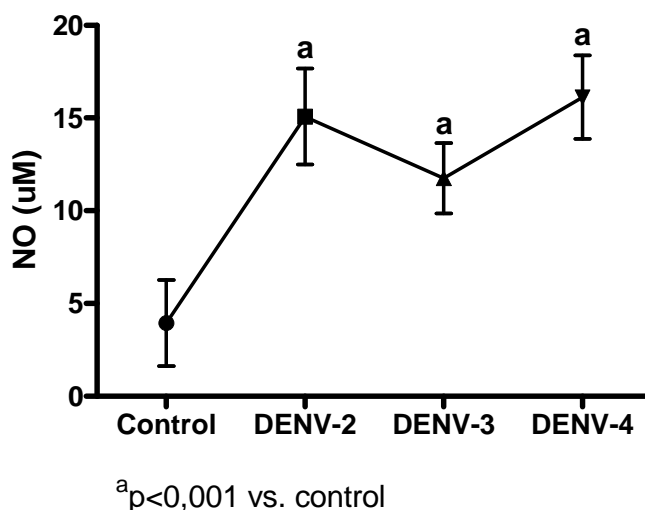


Figura 13. Concentraciones séricas de NO en pacientes con infección aguda por virus dengue, relacionadas al serotipo viral infectante. Las concentraciones de óxido nítrico se determinaron mediante un ensayo de diazotización basado en la reacción de Griess en suero de los pacientes con dengue en fase aguda (n=70). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.3.- Análisis del efecto del DENV sobre la producción de citoquinas, antioxidantes y radicales libres en cultivo de monocitos procedentes de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos estimulados con LPS e infectados experimentalmente con virus dengue.

En esta fase de nuestro trabajo, nos planteamos investigar el efecto del virus dengue sobre monocitos cultivados. Estudiamos la acción del virus sobre la producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , la generación de radicales libres y antioxidantes. Además, se analizaron comparativamente el efecto del virus sobre los monocitos de individuos estratificados por edad, específicamente, recién nacidos, adultos jóvenes y ancianos.

IV.3.1.- Concentraciones de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Se estimó conveniente analizar la producción de citoquinas *in vitro* en cultivos de monocitos de pacientes aparentemente sanos infectados con DENV y bajo estímulo con LPS, evaluando la concentración de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el sobrenadante de estas células a diferentes días post-infección. Así, se observó que las concentraciones de TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de monocitos estratificados por edad estimulados con LPS (Neonatos= 137,8 \pm 2,572 pg/mg de proteína; Adultos= 309,5 \pm 6,659 pg/mg de proteína y Ancianos= 158,3 \pm 2,374 pg/mg de proteína) e infectados experimentalmente por DENV-2 (Neonatos= 132,1 \pm 2,408 pg/mg de proteína; Adultos= 230,6 \pm 1,203 pg/mg de proteína y Ancianos= 155,2 \pm 0,576 pg/mg de proteína) mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos estudiados (**Neonatos**: Control= 9,568 \pm 0,662 pg/mg de proteína; DENV-1= 63,76 \pm 4,247 pg/mg de proteína; DENV-3= 62,33 \pm 3,535 pg/mg de proteína; DENV-4= 65,7 \pm 1,951 pg/mg de proteína. **Adultos**: Control= 15,29 \pm 0,163 pg/mg de proteína; DENV-1= 135,9 \pm 1,036 pg/mg de proteína; DENV-3= 130,7 \pm 0,859 pg/mg de proteína; DENV-4= 133,5 \pm 1,55 pg/mg de proteína. **Ancianos**: Control= 10,04 \pm 0,074 pg/mg de proteína; DENV-1= 85,09 \pm 1,38 pg/mg de proteína; DENV-3= 90,06 \pm 1,041 pg/mg de proteína; DENV-4= 86,27 \pm 4,309 pg/mg de proteína) al primer día PI, así como una $p < 0,001$ en los monocitos infectados por DENV-1, DENV-3 y DENV-4 con respecto al control.

De igual manera, se evidenció el mismo comportamiento al 3er día PI con diferencias significativas ($p<0,001$) entre en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, adultos y ancianos estimulados con LPS (Neonatos= $188,8\pm6,187$ pg/mg de proteína; Adultos= $335,8\pm4,531$ pg/mg de proteína y Ancianos= $213\pm5,706$ pg/mg de proteína) e infectados experimentalmente por DENV-2 (Neonatos= $185,3\pm3,109$ pg/mg de proteína; Adultos= $261,7\pm1,032$ pg/mg de proteína y Ancianos= $202,8\pm4,411$ pg/mg de proteína) con respecto al resto de los grupos estudiados (**Neonatos**: Control= $12\pm0,434$ pg/mg de proteína; DENV-1= $71,34\pm1,943$ pg/mg de proteína; DENV-3= $78,27\pm1,615$ pg/mg de proteína; DENV-4= $75,79\pm0,537$ pg/mg de proteína. **Adultos**: Control= $17,26\pm0,405$ pg/mg de proteína; DENV-1= $162,1\pm2,653$ pg/mg de proteína; DENV-3= $156,6\pm1,462$ pg/mg de proteína; DENV-4= $157\pm2,767$ pg/mg de proteína. **Ancianos**: Control= $13,76\pm0,278$ pg/mg de proteína; DENV-1= $92,29\pm2,032$ pg/mg de proteína; DENV-3= $98,78\pm0,806$ pg/mg de proteína; DENV-4= $97,79\pm1,905$ pg/mg de proteína) al primer día PI, así como una $p<0,001$ en los monocitos infectados por DENV-1, DENV-3 y DENV-4 con respecto al control.

Por otra parte, hubo incremento ($p<0,05$) en las concentraciones de TNF- α entre los grupos infectados por DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y los estimulados por LPS, tanto de neonatos, adultos y ancianos del tercer día PI en relación al primer día PI, no así para el control y DENV-1 (Figura 14).

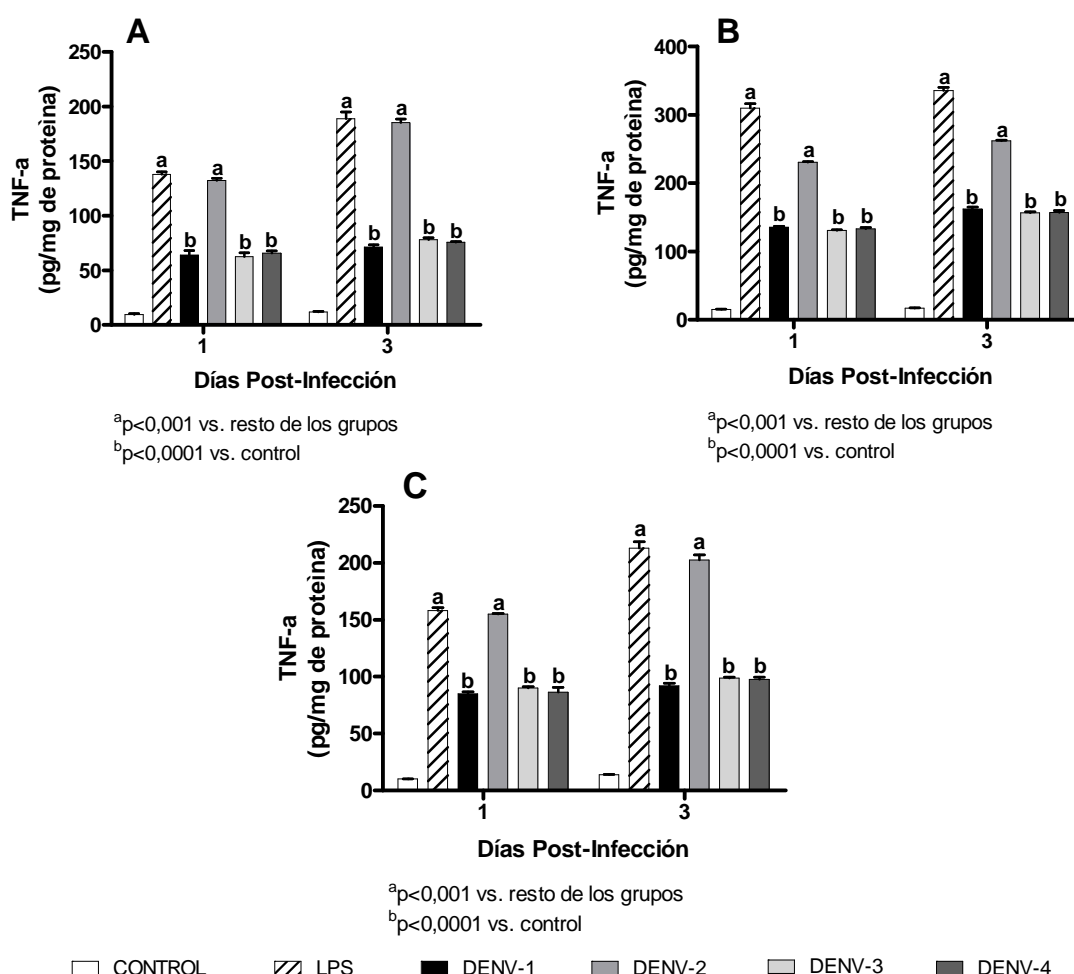


Figura 14. Concentraciones de TNF- α en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles respectivos (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Al analizar las concentraciones de TNF- α en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección, se observó que existen diferencias significativas en los monocitos de adultos con respecto a los de neonatos y de ancianos, $p < 0,05$ para el control y $p < 0,001$ para LPS, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Así mismo, los ancianos resultaron diferentes a los neonatos ($p < 0,001$ LPS, $p < 0,01$ DENV-1, $p < 0,05$ DENV-2 y $p < 0,001$ para DENV-3 y DENV-4), sin diferencias entre los controles de los 3 grupos etarios (Figura 15).

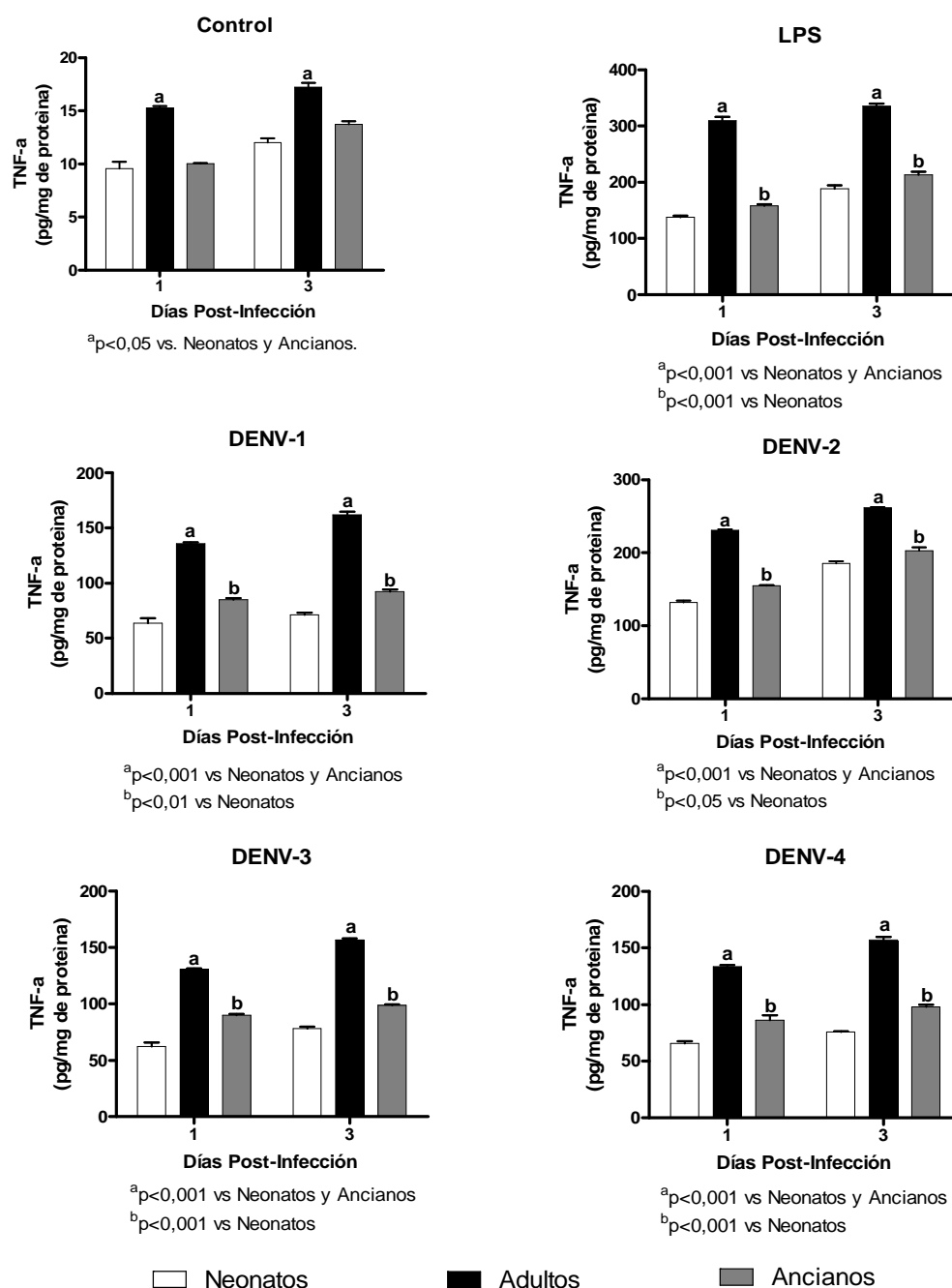


Figura 15. Concentraciones de TNF- α en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

En cuanto a las concentraciones de IL-6 se obtuvieron diferencias significativas en los sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad estimulados con LPS (Neonatos= $259 \pm 23,47$ pg/mg de proteína; Adultos= $553,9 \pm 11,8$ pg/mg de proteína y Ancianos= $405 \pm 6,484$ pg/mg de proteína) e infectados por DENV-4 (Neonatos= $215,2 \pm 5,381$ pg/mg de proteína; Adultos= $396,7 \pm 7,488$ pg/mg de proteína y Ancianos= $367,1 \pm 5,142$ pg/mg de proteína) ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos estudiados (**Neonatos**: Control= $60,89 \pm 5,3$ pg/mg de proteína; DENV-1= $147,9 \pm 12,47$ pg/mg de proteína; DENV-2= $165,7 \pm 5,774$ pg/mg de proteína y DENV-3= $140,4 \pm 7,506$ pg/mg de proteína. **Adultos**: Control= $105,2 \pm 1,212$ pg/mg de proteína; DENV-1= $279,5 \pm 12,68$ pg/mg de proteína; DENV-2= $259,4 \pm 16,49$ pg/mg de proteína y DENV-3= $279 \pm 8,591$ pg/mg de proteína. **Ancianos**: Control= $90,03 \pm 2,082$ pg/mg de proteína; DENV-1= $238,3 \pm 10,72$ pg/mg de proteína; DENV-2= $212,4 \pm 6,651$ pg/mg de proteína y DENV-3= $243,7 \pm 27,3$ pg/mg de proteína) al primer día PI, así como una $p < 0,0001$ en los monocitos infectados por DENV-1, DENV-2 y DENV-3 con respecto al control.

Así mismo, se evidenció un comportamiento similar al 3er día PI con diferencias significativas entre en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos ($p < 0,05$), adultos ($p < 0,0001$) y ancianos ($p < 0,0001$) bajo estímulo con LPS (Neonatos= $314,3 \pm 5,665$ pg/mg de proteína; Adultos= $610,7 \pm 7,254$ pg/mg de proteína y Ancianos= $469,8 \pm 8,064$ pg/mg de proteína) e infectados por DENV-4 (Neonatos= $298,3 \pm 3,501$ pg/mg de proteína; Adultos= $473,1 \pm 21,63$ pg/mg de proteína y Ancianos= $397,6 \pm 4,797$ pg/mg de proteína) con respecto al resto de los

grupos estudiados (**Neonatos**: Control= $84,38 \pm 4,265$ pg/mg de proteína; DENV-1= $217,7 \pm 2,309$ pg/mg de proteína; DENV-2= $219 \pm 11,55$ pg/mg de proteína y DENV-3= $189 \pm 6,326$ pg/mg de proteína. **Adultos**: Control= $122,7 \pm 2,29$ pg/mg de proteína; DENV-1= $310,8 \pm 2,603$ pg/mg de proteína; DENV-2= $293,3 \pm 4,687$ pg/mg de proteína y DENV-3= $314,7 \pm 5,228$ pg/mg de proteína. **Ancianos**: Control= $111,6 \pm 6,432$ pg/mg de proteína; DENV-1= $289,4 \pm 3,434$ pg/mg de proteína; DENV-2= $259,3 \pm 7,57$ pg/mg de proteína y DENV-3= $286 \pm 8,598$ pg/mg de proteína) al primer día PI, así como una $p < 0,0001$ en los monocitos infectados por DENV-1, DENV-2 y DENV-3 con respecto al control.

Por otra parte, hubo incremento ($p < 0,001$) en las concentraciones de IL-6 en los sobrenadantes de monocitos infectados con DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y estimulados con LPS en neonatos del tercer día PI en relación al primer día PI. Los adultos solo mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en los monocitos con LPS y DENV-4. Mientras que los ancianos solo los grupos con LPS, DENV-1, DENV-2 y DENV-3 resultaron diferentes ($p < 0,01$) en ambos días PI (Figura 16).

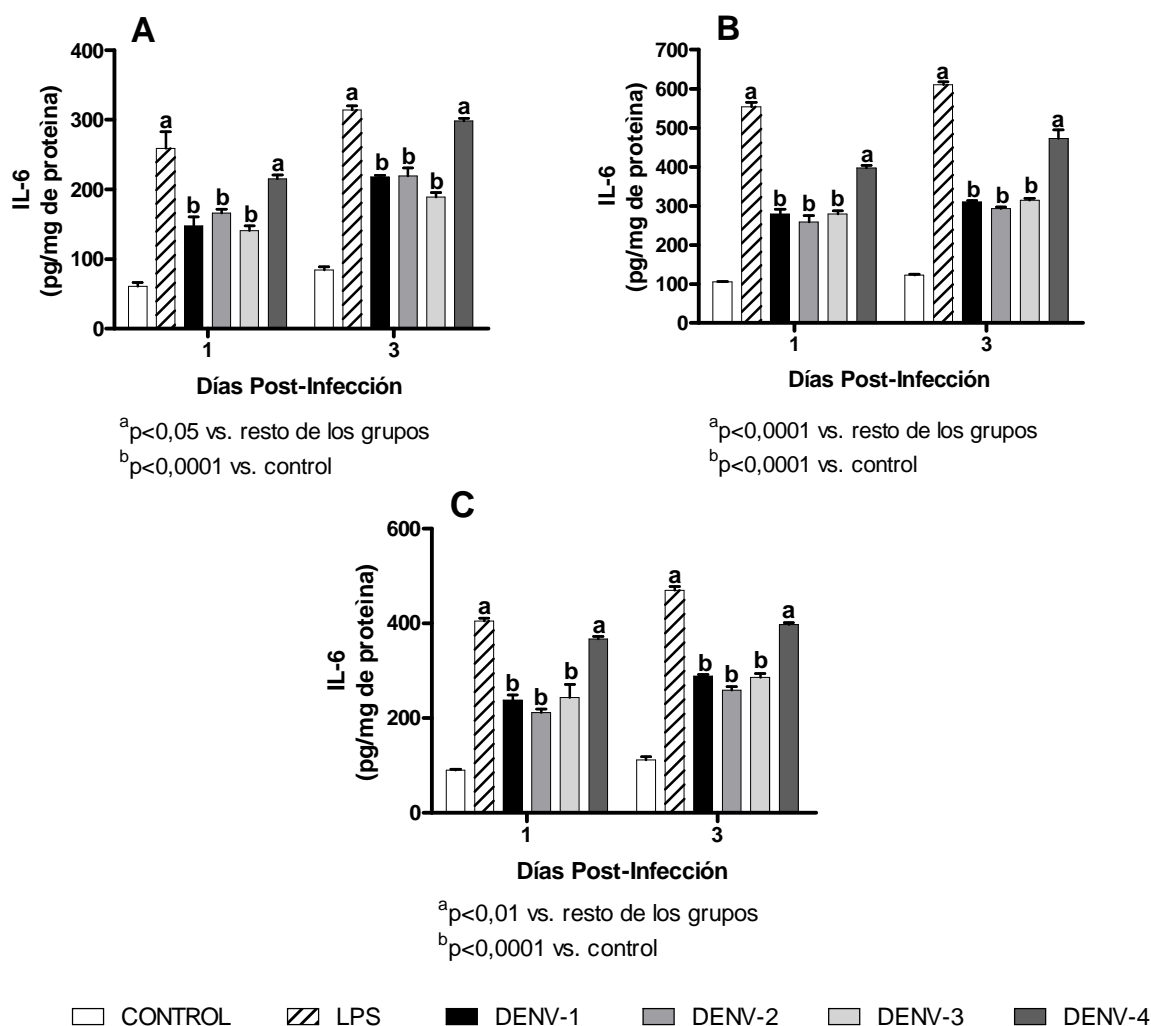


Figura 16. Concentraciones de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ en 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

En cuanto a las concentraciones de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección, se observó que existen diferencias significativas en los niveles del control ($p < 0,05$), DENV-1 ($p < 0,001$) y DENV-3 ($p < 0,0001$) en adultos y ancianos cuando se compararon con los neonatos. Mientras que en LPS ($p < 0,01$), DENV-2 ($p < 0,05$), y DENV-4 ($p < 0,001$), los niveles de esta citoquina en adultos resultaron más altas que en neonatos y ancianos, tanto al primer día como al tercer día PI (Figura 17).

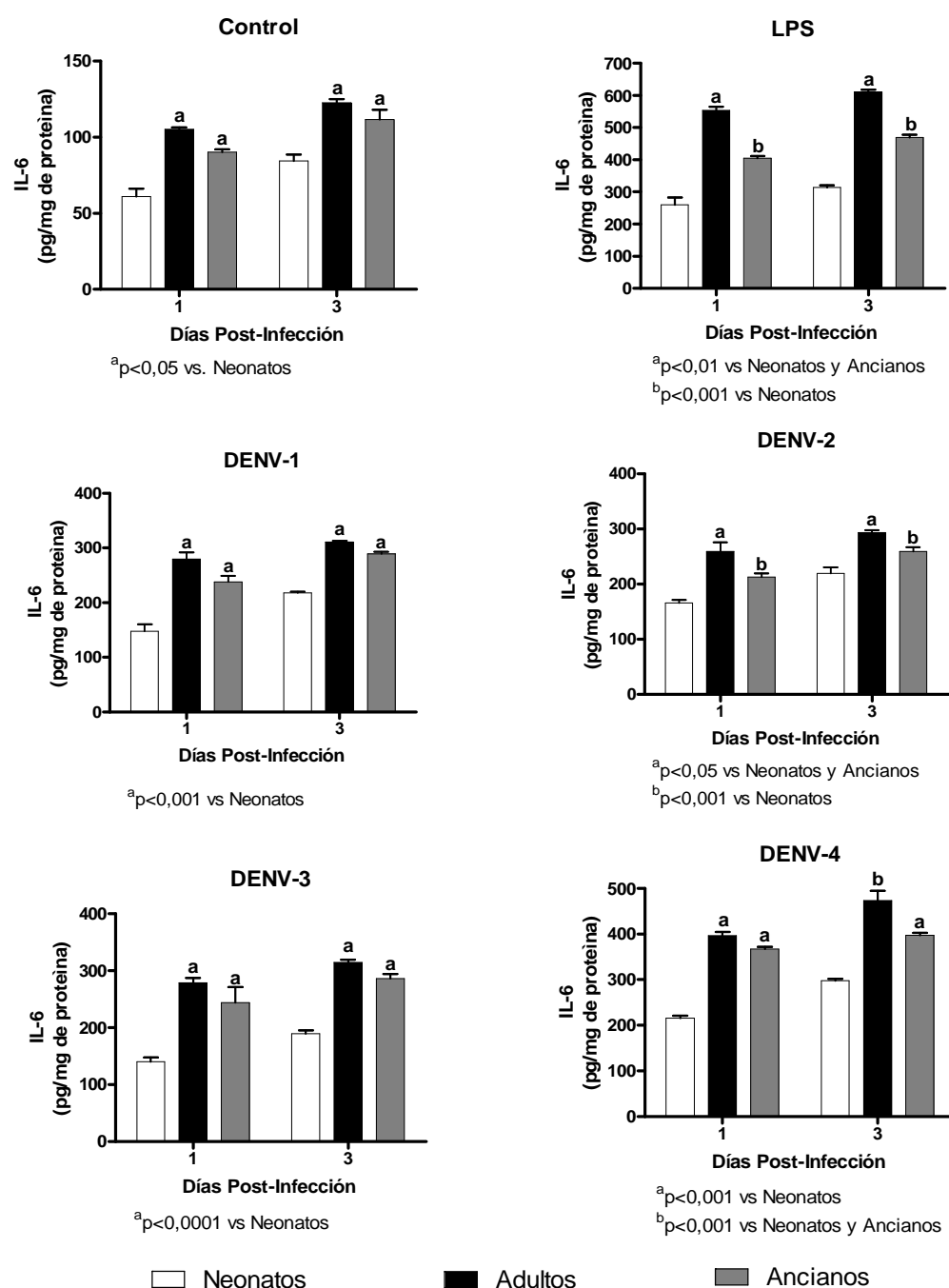


Figura 17. Concentraciones de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $X \pm DE$ en 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Las concentraciones de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad estimulados con LPS (Neonatos= 131,1 \pm 1,686 pg/mg de proteína; Adultos= 180,7 \pm 2,255 pg/mg de proteína y Ancianos= 158,7 \pm 2,529 pg/mg de proteína) y los infectados por DENV-2 (Neonatos= 145,2 \pm 1,64 pg/mg de proteína; Adultos= 195,5 \pm 0,719 pg/mg de proteína y Ancianos= 164 \pm 0,356 pg/mg de proteína) resultaron diferentes ($p < 0,0001$) al resto de los grupos estudiados (**Neonatos**: Control= 11,04 \pm 0,327 pg/mg de proteína; DENV-1= 43,84 \pm 0,356 pg/mg de proteína; DENV-3= 54,59 \pm 0,927 pg/mg de proteína y DENV-4= 43,06 \pm 0,641 pg/mg de proteína. **Adultos**: Control= 15,95 \pm 1,753 pg/mg de proteína; DENV-1= 74,73 \pm 0,702 pg/mg de proteína; DENV-3= 75,55 \pm 1,654 pg/mg de proteína y DENV-4= 77,31 \pm 1,175 pg/mg de proteína. **Ancianos**: Control= 13,26 \pm 0,1564 pg/mg de proteína; DENV-1= 71,21 \pm 0,938 pg/mg de proteína; DENV-3= 63,15 \pm 0,688 pg/mg de proteína y DENV-4= 68,96 \pm 1,223 pg/mg de proteína) al primer día PI, así como una $p < 0,0001$ en los monocitos infectados por DENV-1, DENV-3 y DENV-4 con respecto al control.

Se evidenció un comportamiento similar al 3er día PI con diferencias significativas ($p < 0,0001$) en las concentraciones IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, adultos y ancianos estimulados con LPS (Neonatos= 175,9 \pm 3,592 pg/mg de proteína; Adultos= 207,1 \pm 5,515 pg/mg de proteína y Ancianos= 199,8 \pm 2,311 pg/mg de proteína) y con DENV-2 (Neonatos= 180,6 \pm 1,077 pg/mg de proteína; Adultos= 223,1 \pm 1,128 pg/mg de proteína y Ancianos= 213,7 \pm 1,141 pg/mg de proteína) con respecto al resto de los grupos estudiados

(**Neonatos:** Control= $15,35 \pm 0,713$ pg/mg de proteína; DENV-1= $56,03 \pm 3,235$ pg/mg de proteína; DENV-3= $65,83 \pm 2,852$ pg/mg de proteína y DENV-4= $62,27 \pm 1,192$ pg/mg de proteína. **Adultos:** Control= $19,2 \pm 0,721$ pg/mg de proteína; DENV-1= $93,59 \pm 2,326$ pg/mg de proteína; DENV-3= $86,72 \pm 2,41$ pg/mg de proteína y DENV-4= $88,17 \pm 1,875$ pg/mg de proteína. **Ancianos:** Control= $17,1 \pm 0,805$ pg/mg de proteína; DENV-1= $83,17 \pm 0,213$ pg/mg de proteína; DENV-3= $71,63 \pm 0,67$ pg/mg de proteína y DENV-4= $74,9 \pm 1,226$ pg/mg de proteína) al primer día PI, así como una $p < 0,0001$ entre los monocitos infectados por DENV-1, DENV-3 y DENV-4 con respecto al grupo control.

Por otra parte, las concentraciones de IL-1 β en neonatos y adultos fueron más altas ($p < 0,01$) en los sobrenadantes de monocitos con LPS, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 al tercer día PI en relación al primer día PI. Mientras que los ancianos solo resultaron diferentes ($p < 0,001$) en los grupos infectados por LPS, DENV-1, DENV-2 y DENV-3 (Figura 18).

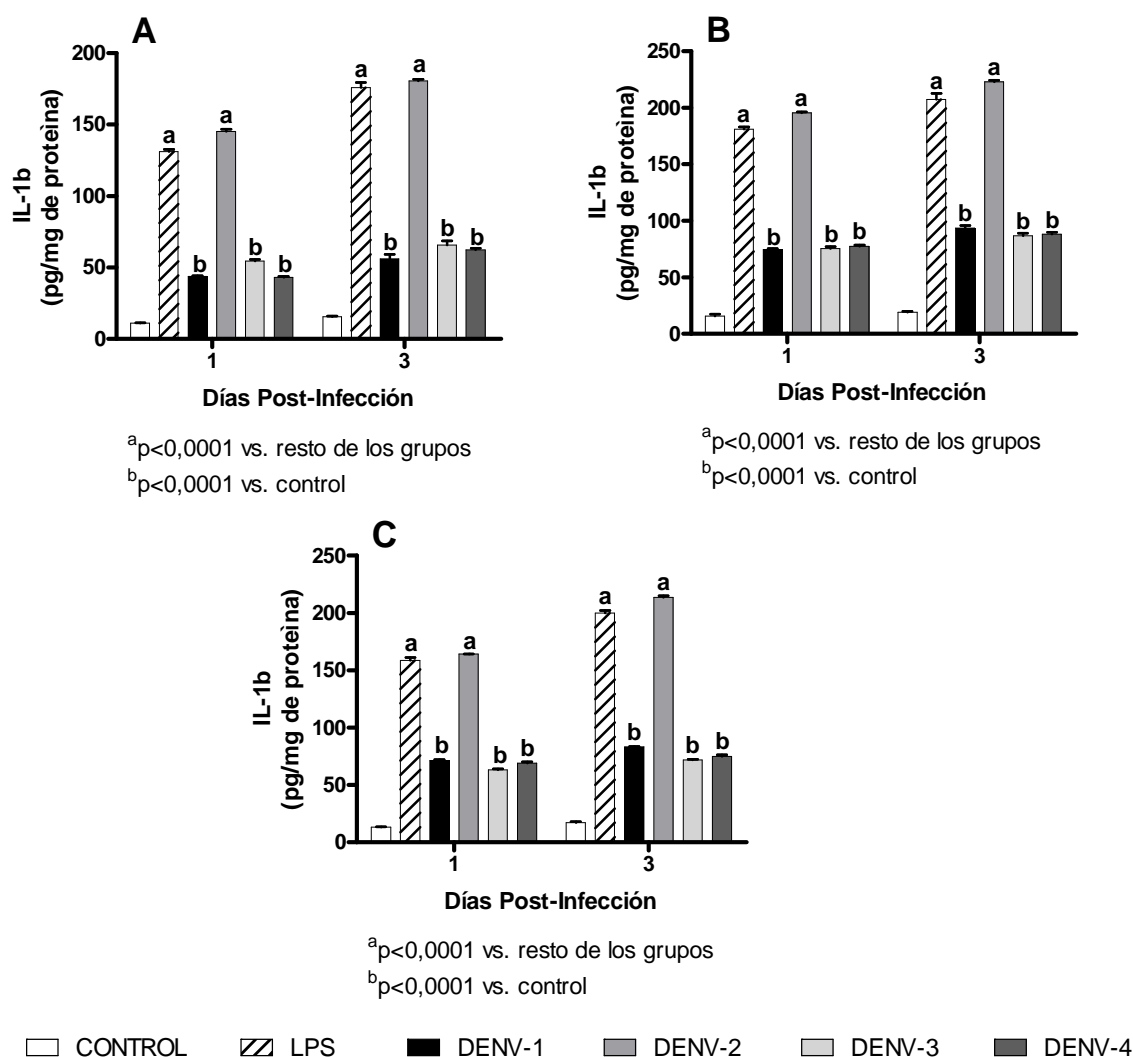


Figura 18. Concentraciones de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ en 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

En cuanto a las concentraciones de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección, se observó que existen diferencias significativas en los niveles de esta citoquina en monocitos infectados por DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y estimulados con LPS ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$ y $p<0,01$ respectivamente) en los monocitos de adultos al compararse con los de neonatos y de ancianos. Así mismo, los ancianos resultaron diferentes a los neonatos ($p<0,01$ LPS, $p<0,01$ para DENV-2, $p<0,05$ para DENV-3 y $p<0,001$ DENV-4), sin diferencias entre los controles de los 3 grupos etarios. Por su parte, las concentraciones en adultos y ancianos de sobrenadantes de monocitos infectados con DENV-1 solo difieren ($p<0,001$) con la de neonatos (Figura 19).

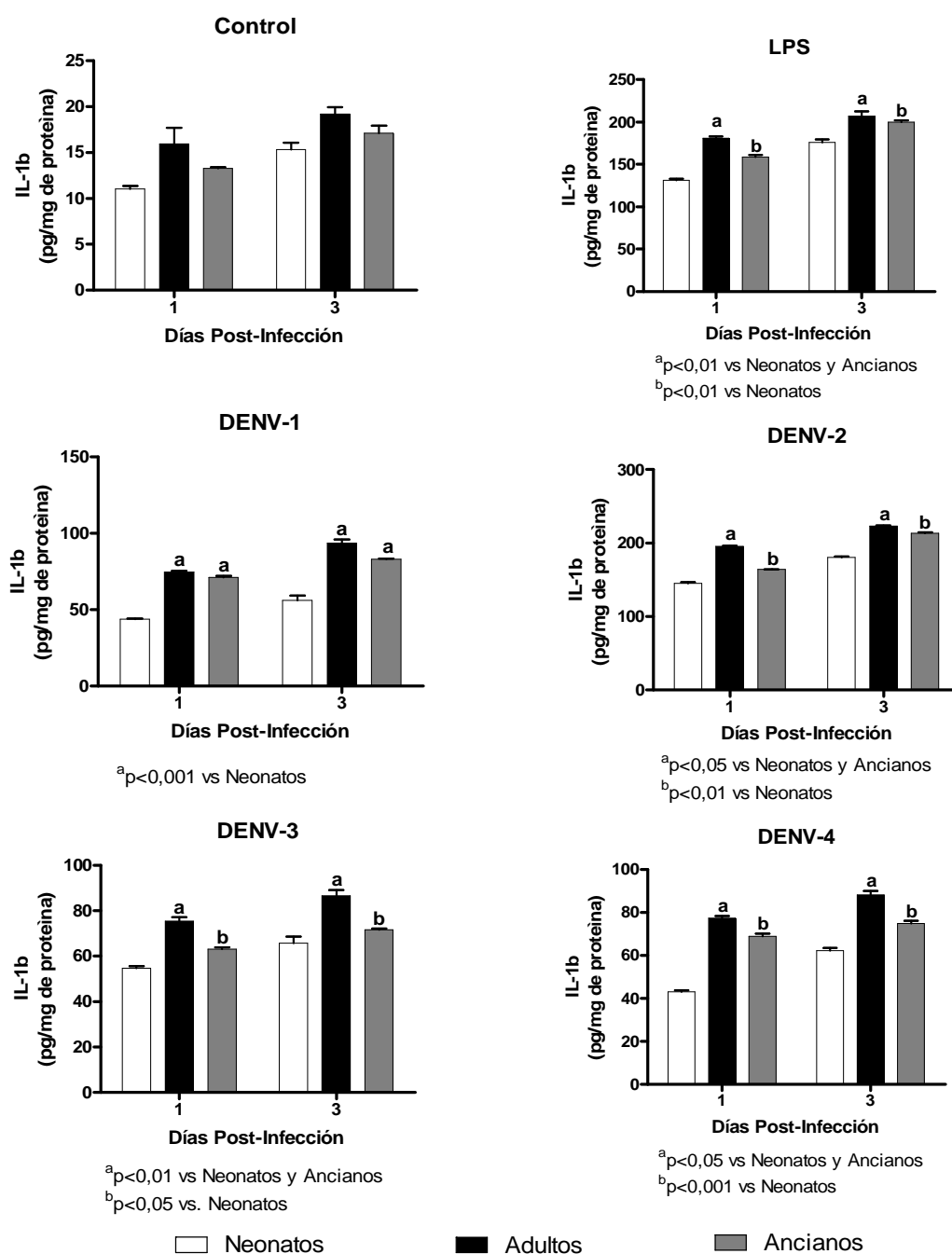


Figura 19. Concentraciones de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.3.2.- Porcentaje de incremento en la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Los datos se presentan como porcentaje de incremento después de la infección de los monocitos de neonatos, adultos jóvenes y ancianos, por los cuatro serotipos del virus dengue, así como los estimulados por LPS, en comparación con los no infectados a diferentes días PI. Se evidencia que los monocitos infectados mostraron un incremento marcado en la producción de las citoquinas TNF- α , seguido de IL-1 β y en menor cantidad IL-6.

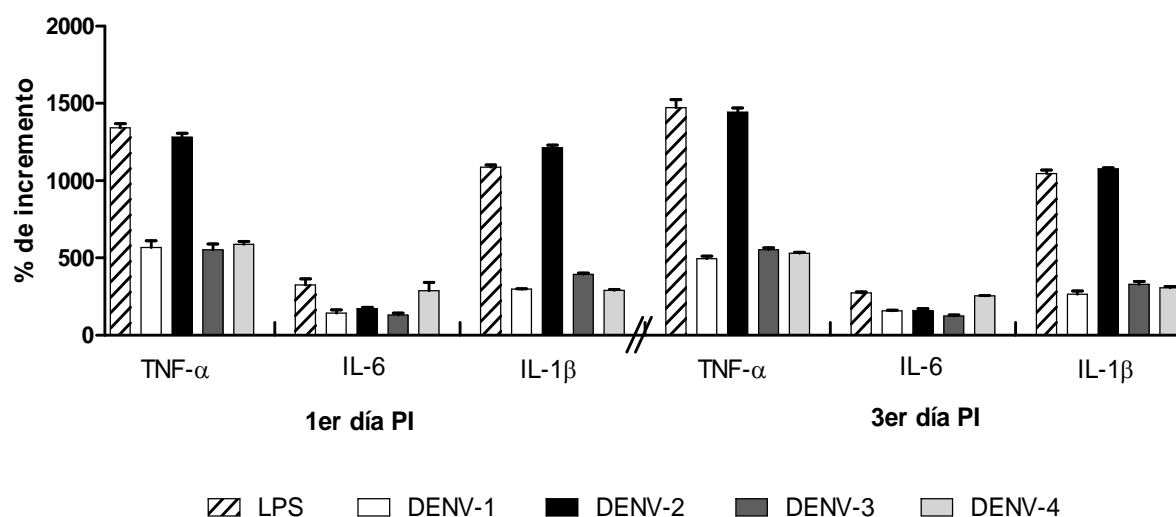


Figura 20. Porcentaje de incremento en la producción de citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $X \pm DE$ del porcentaje de incremento.

El incremento relativo en la producción de las citoquinas en monocitos de neonatos infectados, en relación con los no infectados en el caso de los estimulados con LPS, fue de $\text{TNF-}\alpha = 1342 \pm 26,91\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el tercer día fue de $1473 \pm 51,4\%$; $\text{IL-6} = 325,3 \pm 38,54\%$ al 1^{er} día PI y $272,5 \pm 6,72\%$ al 3^{er} día PI y para $\text{IL-1}\beta = 1087 \pm 15,26\%$ al 1^{er} día PI y $1046 \pm 23,4\%$ al 3^{er} día PI.

En cuanto a los infectados por DENV-1 se observó un aumento para $\text{TNF-}\alpha$ de $566,9 \pm 44,45\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $494,4 \pm 16,23\%$; $\text{IL-6} = 143 \pm 20,49\%$ al 1^{er} día PI y $158 \pm 2,73\%$ al 3^{er} día PI y para $\text{IL-1}\beta = 297 \pm 3,24\%$ al 1^{er} día PI y $265 \pm 21,1\%$ al 3^{er} día PI.

En los infectados por DENV-2 se incrementó el $\text{TNF-}\alpha = 1282 \pm 25,18\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $1444 \pm 25,93\%$; $\text{IL-6} = 172,1 \pm 9,48\%$ al 1^{er} día PI y $159,5 \pm 13,69\%$ al 3^{er} día PI y para $\text{IL-1}\beta = 1215 \pm 14,85\%$ al 1^{er} día PI y $1076 \pm 6,99\%$ al 3^{er} día PI.

En los monocitos infectados por DENV-3 se elevó el $\text{TNF-}\alpha$ de $551,9 \pm 36,96\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $552,2 \pm 13,47\%$; $\text{IL-6} = 130,6 \pm 12,33\%$ al 1^{er} día PI y $124 \pm 7,5\%$ al 3^{er} día PI y para $\text{IL-1}\beta = 394,4 \pm 8,36\%$ al 1^{er} día PI y $328,8 \pm 10,58\%$ al 3^{er} día PI.

En cuanto a los infectados por DENV-4 se incrementó el $\text{TNF-}\alpha$ a $587,2 \pm 20,42\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $531,5 \pm 4,74\%$; $\text{IL-6} =$

286,9±53,65% al 1^{er} día PI y 253,5±4,15% al 3^{er} día PI y para IL-1 β = 289,9±5,8% al 1^{er} día PI y 305,6±7,74% al 3^{er} día PI (Figura 20).

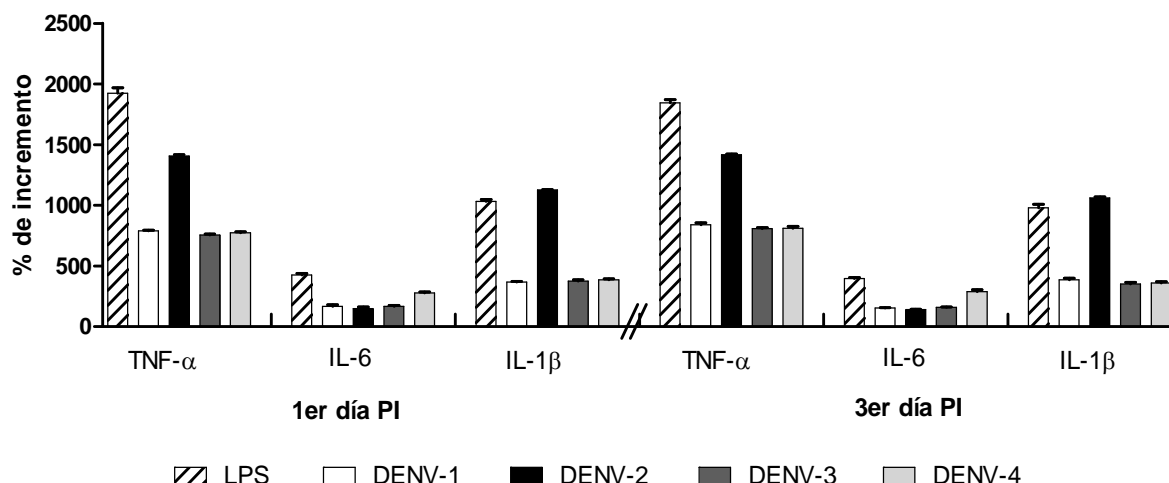


Figura 21. Porcentaje de incremento en la producción de citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de adultos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ del porcentaje de incremento.

En los monocitos de adultos jóvenes infectados experimentalmente por serotipos del virus dengue y estimulados con LPS, el incremento en la producción de las citoquinas, en relación con los no infectados en el caso de LPS, fue de TNF- α = 1924±43,55% al 1^{er} día PI, mientras que para el tercer día fue de 1845±26,25%; IL-6= 426,5±11,22% al 1^{er} día PI y 397,7±5,91% al 3^{er} día PI y para IL-1 β = 1033±14,14% al 1^{er} día PI y 978,5±28,72% al 3^{er} día PI.

En cuanto a los infectados por DENV-1 se observó un incremento para TNF- α de $788,7 \pm 6,79\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $839,3 \pm 15,35\%$; IL-6= $165,7 \pm 12,05\%$ al 1^{er} día PI y $153,3 \pm 2,12\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $368,5 \pm 4,4\%$ al 1^{er} día PI y $387,4 \pm 12,12\%$ al 3^{er} día PI.

En los infectados por DENV-2 se incrementó el TNF- α = $1444 \pm 25,93\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $1408 \pm 7,85\%$; IL-6= $146,6 \pm 15,68\%$ al 1^{er} día PI y $139,1 \pm 3,82\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $1125 \pm 4,52\%$ al 1^{er} día PI y $1062 \pm 5,86\%$ al 3^{er} día PI.

En los monocitos infectados por DENV-3 se mostró un incremento de TNF- α de $754,8 \pm 5,62\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $807,3 \pm 8,47\%$; IL-6= $165,2 \pm 8,16\%$ al 1^{er} día PI y $156,5 \pm 4,26\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $373,6 \pm 10,39\%$ al 1^{er} día PI y $351,6 \pm 12,54\%$ al 3^{er} día PI.

En cuanto a los monocitos infectados por DENV-4 se incrementó el TNF- α a $773,1 \pm 10,16\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $809,5 \pm 16,02\%$; IL-6= $277,1 \pm 7,12\%$ al 1^{er} día PI y $285,6 \pm 17,63\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $384,6 \pm 7,38\%$ al 1^{er} día PI y $359,2 \pm 9,77\%$ al 3^{er} día PI (Figura 21).

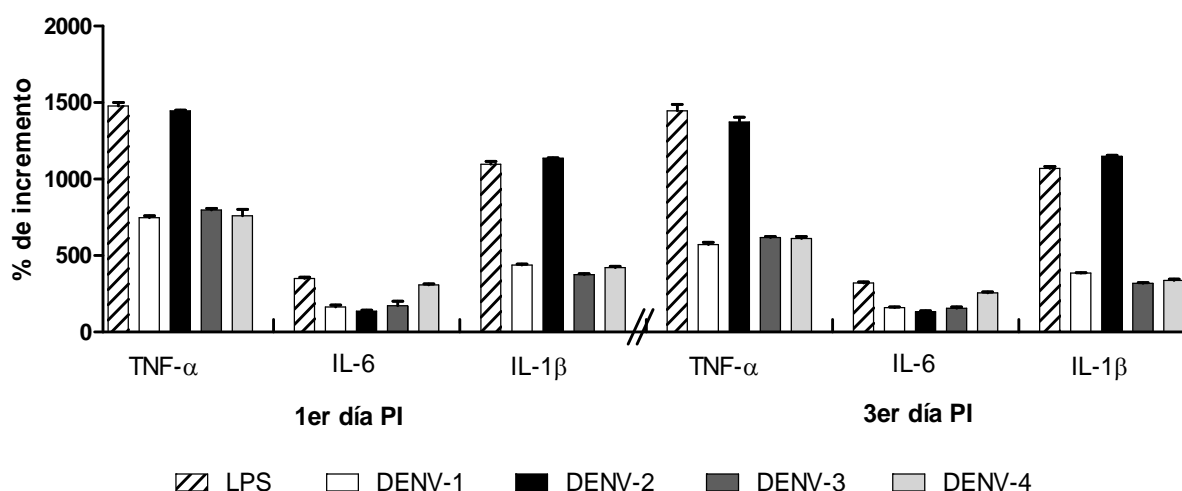


Figura 22. Porcentaje de incremento en la producción de citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de monocitos de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $X \pm DE$ del porcentaje de incremento.

Mientras que en los monocitos de ancianos infectados por serotipos del virus dengue y estimulados con LPS, el incremento en la producción de las citoquinas, en relación con los no infectados en el caso de LPS, fue de TNF- α = $1477 \pm 23,62\%$ al 1^{er} día PI, para el tercer día fue de $1448 \pm 41,47\%$; IL-6= $349,8 \pm 7,2\%$ al 1^{er} día PI y $320,9 \pm 7,22\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $1097 \pm 19,08\%$ al 1^{er} día PI y $1069 \pm 13,51\%$ al 3^{er} día PI.

En cuanto a los infectados por DENV-1 se observó una elevación de TNF- α de $747,4 \pm 13,74\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $570,7 \pm 14,77\%$; IL-6= $164,6 \pm 11,92\%$ al 1^{er} día PI y $159,4 \pm 3,08\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $437 \pm 7,05\%$ al 1^{er} día PI y $386,4 \pm 1,24\%$ al 3^{er} día PI.

En los infectados por DENV-2 se aumentó el TNF- α = $1445 \pm 5,69\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $1374 \pm 32,06\%$; IL-6= $135,9 \pm 7,39\%$ al 1^{er} día PI y $132,4 \pm 6,78\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $1137 \pm 2,7\%$ al 1^{er} día PI y $1150 \pm 6,65\%$ al 3^{er} día PI.

Los monocitos infectados por DENV-3 mostraron un incremento de TNF- α de $796,9 \pm 10,41\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $617,9 \pm 5,84\%$; IL-6= $170,7 \pm 30,32\%$ al 1^{er} día PI y $156,2 \pm 7,7\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $376,2 \pm 5,2\%$ al 1^{er} día PI y $318,8 \pm 3,91\%$ al 3^{er} día PI.

En los monocitos infectados por DENV-4 se elevó el TNF- α de $759,2 \pm 42,94\%$ al 1^{er} día PI, mientras que para el 3^{er} día fue de $610,6 \pm 13,84\%$; IL-6= $307,7 \pm 5,71\%$ al 1^{er} día PI y $256,2 \pm 4,3\%$ al 3^{er} día PI y para IL-1 β = $420 \pm 9,19\%$ al 1^{er} día PI y $338 \pm 7,15\%$ al 3^{er} día PI (Figura 22).

IV.3.3.- Niveles de antioxidantes CAT, SOD y GSH.

Al relacionar la actividad de la catalasa con el serotipo viral infectante en lisados celulares de monocitos estratificados por edad, estimulados con LPS e infectados experimentalmente por serotipos de virus dengue a diferentes días PI (1 y 3) se observó que al primer día hubo incremento ($p<0,05$) en los niveles de CAT en los grupos estimulados con LPS (Neonatos: $11,75\pm0,902$ nmol/min/mg de proteína, Adultos: $17,62\pm1,14$ nmol/min/mg de proteína, Ancianos: $15,84\pm0,993$ nmol/min/mg de proteína) al compararse con el resto de los grupos (**Neonatos:** Control= $3,381\pm0,521$, DENV-1= $9,624\pm0,166$ nmol/min/mg de proteína, DENV-2= $8,826\pm0,637$ nmol/min/mg de proteína, DENV-3= $7,757\pm0,533$ nmol/min/mg de proteína y DENV-4= $9,669\pm0,528$ nmol/min/mg de proteína. **Adultos:** Control= $6,513\pm0,794$ nmol/min/mg de proteína, DENV-1= $15,14\pm0,505$ nmol/min/mg de proteína, DENV-2= $12,74\pm0,239$ nmol/min/mg de proteína, DENV-3= $12,56\pm0,504$ nmol/min/mg de proteína y DENV-4= $15,03\pm0,119$ nmol/min/mg de proteína. **Ancianos:** Control= $3,824\pm0,627$ nmol/min/mg de proteína, DENV-1= $12,19\pm0,504$ nmol/min/mg de proteína, DENV-2= $10,14\pm0,507$ nmol/min/mg de proteína, DENV-3= $9,984\pm0,186$ nmol/min/mg de proteína y DENV-4= $11,81\pm0,3$ nmol/min/mg de proteína). Además, se encontraron diferencias ($p<0,001$) entre los monocitos infectados por DENV-1 y DENV-4 al compararse con DENV-3 en sobrenadantes de monocitos provenientes de neonatos, mientras que en adultos y ancianos, los monocitos infectados por DENV-1 y DENV-4 resultaron diferentes a DENV-2 y DENV-3. De igual manera, DENV-2 y DENV-3 se incrementaron con respecto al grupo control ($p<0,0001$).

Al tercer día PI, los niveles de LPS (Neonatos: $13,18 \pm 0,574$ nmol/min/mg de proteína, Adultos: $19,65 \pm 0,969$ nmol/min/mg de proteína y Ancianos: $18,49 \pm 1,005$ nmol/min/mg de proteína) en neonatos, adultos y ancianos fueron más altas ($p < 0,05$) que el resto de los grupos (**Neonatos**: Control= $4,382 \pm 0,016$ nmol/min/mg de proteína, DENV-1= $11,71 \pm 0,424$ nmol/min/mg de proteína, DENV-2= $10,43 \pm 0,519$ nmol/min/mg de proteína, DENV-3= $9,469 \pm 0,504$ nmol/min/mg de proteína y DENV-4= $11,74 \pm 0,07$ nmol/min/mg de proteína. **Adultos**: Control= $8,645 \pm 0,609$ nmol/min/mg de proteína, DENV-1= $16,21 \pm 0,656$ nmol/min/mg de proteína, DENV-2= $14,72 \pm 0,636$ nmol/min/mg de proteína, DENV-3= $14,29 \pm 0,577$ nmol/min/mg de proteína y DENV-4= $16,98 \pm 0,583$ nmol/min/mg de proteína. **Ancianos**: Control= $5,822 \pm 0,41$ nmol/min/mg de proteína, DENV-1= $13,46 \pm 0,339$ nmol/min/mg de proteína, DENV-2= $11,87 \pm 0,62$ nmol/min/mg de proteína, DENV-3= $11,5 \pm 0,621$ nmol/min/mg de proteína y DENV-4= $13,37 \pm 0,342$ nmol/min/mg de proteína). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los monocitos infectados por DENV-1 y DENV-4 al compararse con DENV-3 en sobrenadante de monocitos provenientes de neonatos, mientras que en adultos y ancianos el grupo de DENV-4 resultó más alto ($p < 0,05$) que DENV-2 y DENV-3. De igual manera, los serotipos 1, 2 y 3 del dengue se mostraron elevados con respecto al grupo control ($p < 0,0001$).

Sin embargo, no existen diferencias estadísticas en los grupos estudiados en relación a los días PI, a excepción de los niveles obtenidos en monocitos de

ancianos estimulados con LPS ($p<0,01$) los cuales se encontraron más elevados al tercer día (Figura 23).

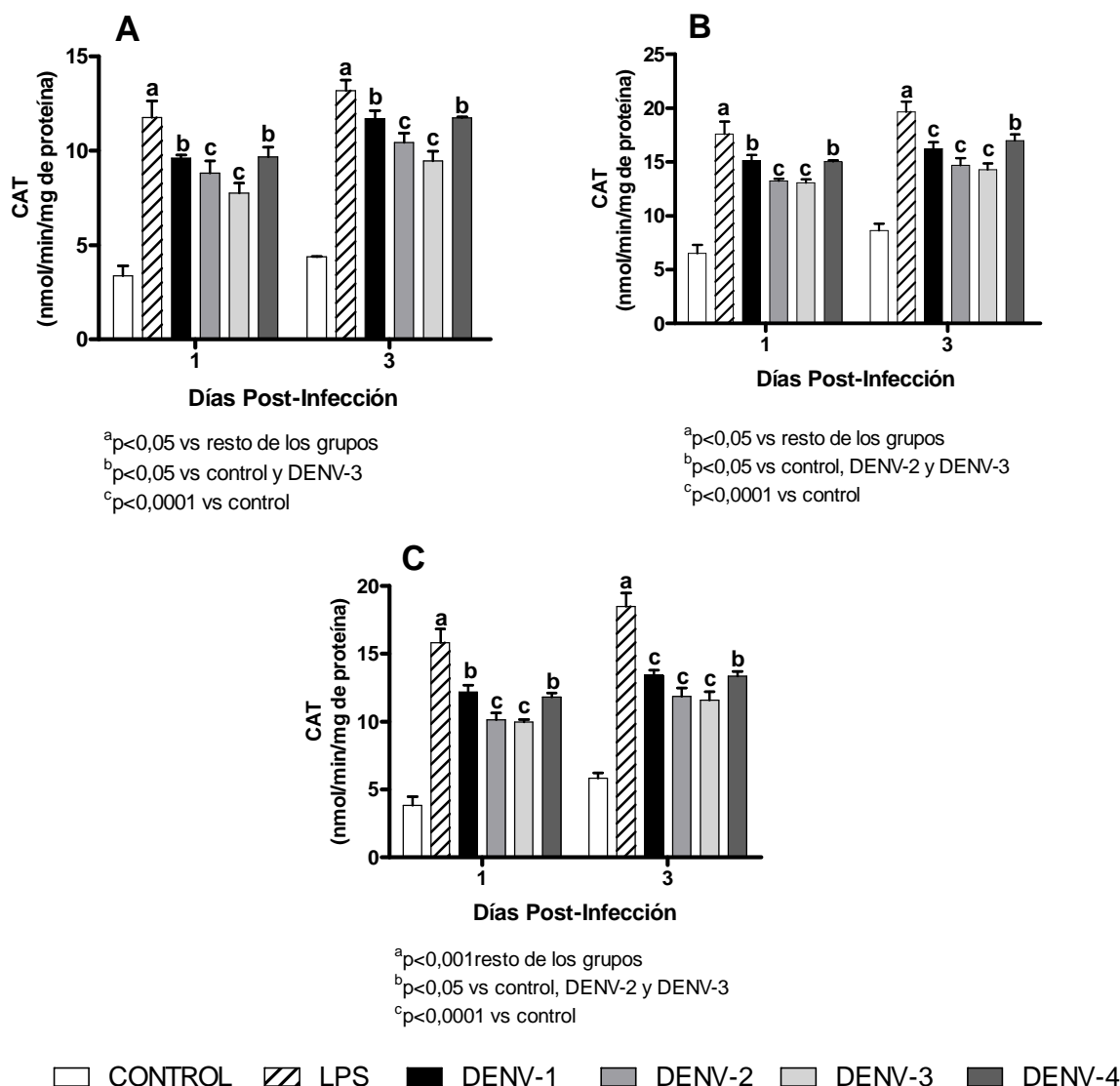


Figura 23. Actividad de CAT lisados de cultivo de monocitos estratificados por edad, infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. Las concentraciones se determinaron a través de la medición de la actividad enzimática en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$), ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). Los datos representan $X \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

En cuanto a la actividad de CAT en sobrenadantes de lisados celulares de monocitos cultivados de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días PI, se observó que existen diferencias significativas ($p < 0,01$) en los niveles del control, DENV-2 y DENV-4 en adultos con respecto a los neonatos y ancianos a los días 1 y 3 PI. Los infectados con LPS mostraron diferencias ($p < 0,01$) entre adultos con respecto a los neonatos y ancianos al día 1 PI, mientras que al día 3 la actividad de la CAT en adultos y ancianos se incrementó ($p < 0,01$) con respecto a los neonatos. En el caso de DENV-1 y DENV-3 los adultos difieren significativamente ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente) de los neonatos y ancianos al primer día PI, y al tercer día la actividad es mayor ($p < 0,01$) en adultos al compararse con neonatos (Figura 24).

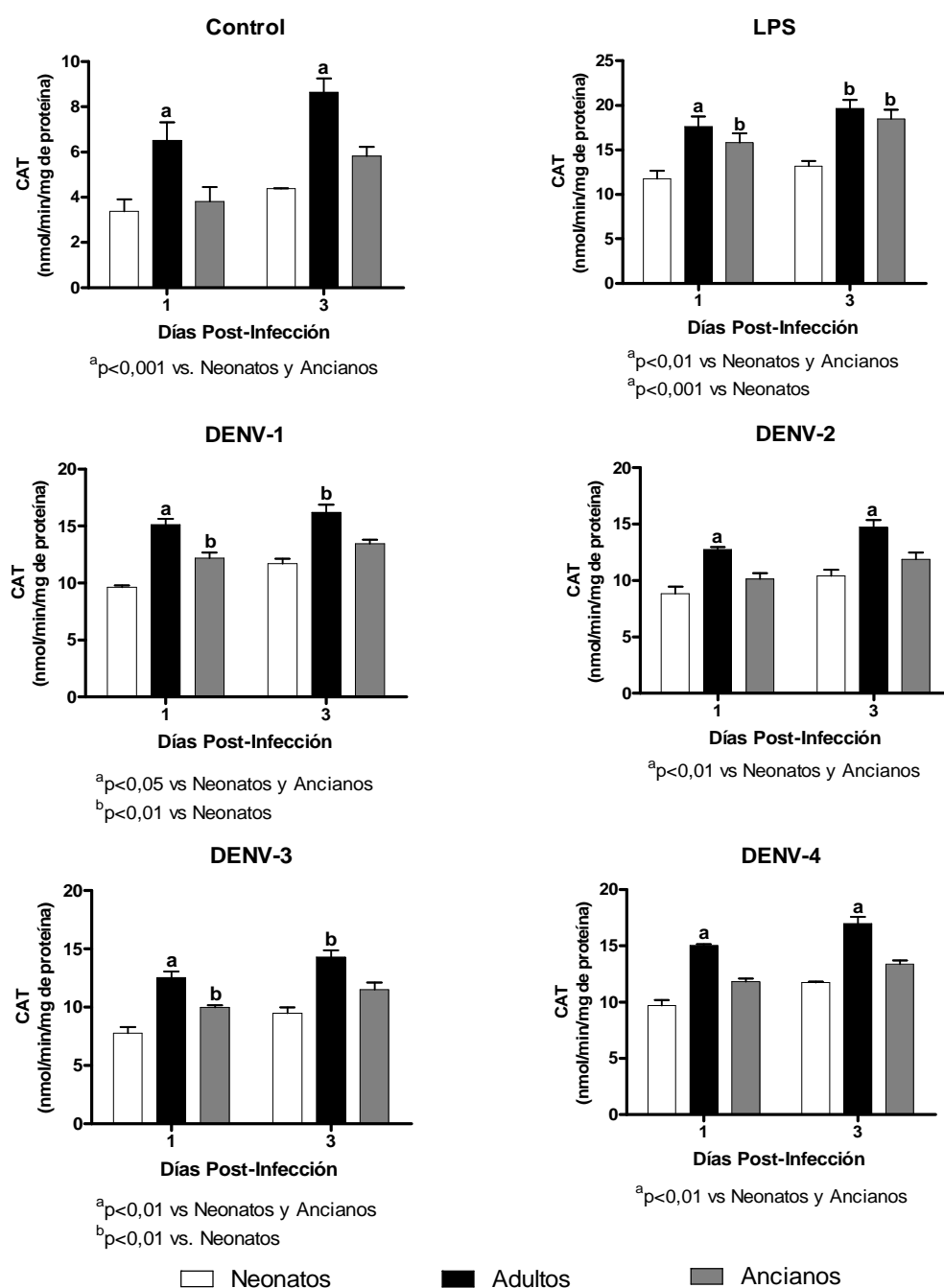


Figura 24. Actividad de CAT en lisados de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron a través de la medición de la actividad enzimática en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Al analizar la actividad de la SOD con el serotipo viral infectante en lisados celulares de monocitos estratificados por edad, estimulados con LPS e infectados experimentalmente por serotipos de virus dengue a diferentes días PI (1 y 3) se observó que al primer día la actividad de la enzima se incremento ($p<0,05$) en los grupos con LPS (Neonatos: $8,78\pm0,501$ U/mg de proteína, Adultos: $12,15\pm0,285$ U/mg de proteína, Ancianos: $14,27\pm0,462$ U/mg de proteína) y DENV-1 (Neonatos: $8,23\pm0,922$ U/mg de proteína, Adultos: $11,63\pm0,369$ U/mg de proteína, Ancianos: $13,66\pm0,631$ U/mg de proteína) al compararse con el resto de los grupos estudiados (**Neonatos**: Control= $0,733\pm0,128$ U/mg de proteína, DENV-2= $5,97\pm0,644$ U/mg de proteína, DENV-3= $5,62\pm0,2417$ U/mg de proteína y DENV-4= $6,636\pm0,273$ U/mg de proteína. **Adultos**: Control= $0,91\pm0,016$ U/mg de proteína, DENV-2= $10,11\pm0,225$ U/mg de proteína, DENV-3= $10,11\pm0,177$ U/mg de proteína y DENV-4= $10,49\pm0,966$ U/mg de proteína. **Ancianos**: Control= $1,078\pm0,112$ U/mg de proteína, DENV-2= $11,87\pm0,354$ U/mg de proteína, DENV-3= $10,82\pm0,692$ U/mg de proteína y DENV-4= $10,94\pm0,531$ U/mg de proteína). Además, se encontraron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre los serotipos 2, 3 y 4 al compararse con el grupo control.

Al tercer día PI, los resultados fueron similares donde los niveles de SOD en monocitos estimulados con LPS (Neonatos: $9,44\pm0,182$ U/mg de proteína, Adultos: $12,71\pm0,544$ U/mg de proteína y Ancianos: $14,69\pm1,015$ U/mg de proteína) e infectados por DENV-1 (Neonatos: $8,54\pm0,303$ U/mg de proteína, Adultos: $11,79\pm0,641$ U/mg de proteína, Ancianos: $13,78\pm0,73$ U/mg de proteína) en neonatos, adultos jóvenes y ancianos se elevaron ($p<0,05$) con respecto al resto de

los grupos (**Neonatos**: Control= $0,82 \pm 0,161$ U/mg de proteína, DENV-2= $6,49 \pm 0,759$ U/mg de proteína, DENV-3= $6,63 \pm 0,322$ U/mg de proteína y DENV-4= $6,84 \pm 0,364$ U/mg de proteína. **Adultos**: Control= $1,15 \pm 0,322$ U/mg de proteína, DENV-2= $10,12 \pm 0,016$ U/mg de proteína, DENV-3= $10,62 \pm 0,064$ U/mg de proteína y DENV-4= $10,82 \pm 0,402$ U/mg de proteína. **Ancianos**: Control= $1,13 \pm 0,225$ U/mg de proteína, DENV-2= $12,09 \pm 0,112$ U/mg de proteína, DENV-3= $11,41 \pm 0,386$ U/mg de proteína y DENV-4= $11,83 \pm 0,386$ U/mg de proteína). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en monocitos infectados por DENV-2, DENV-3 y DENV-4 al compararse con el control en neonatos, adultos jóvenes y ancianos.

Sin embargo, no existen diferencias estadísticas en los grupos estudiados en relación a los días 1 y 3 PI (Figura 25).

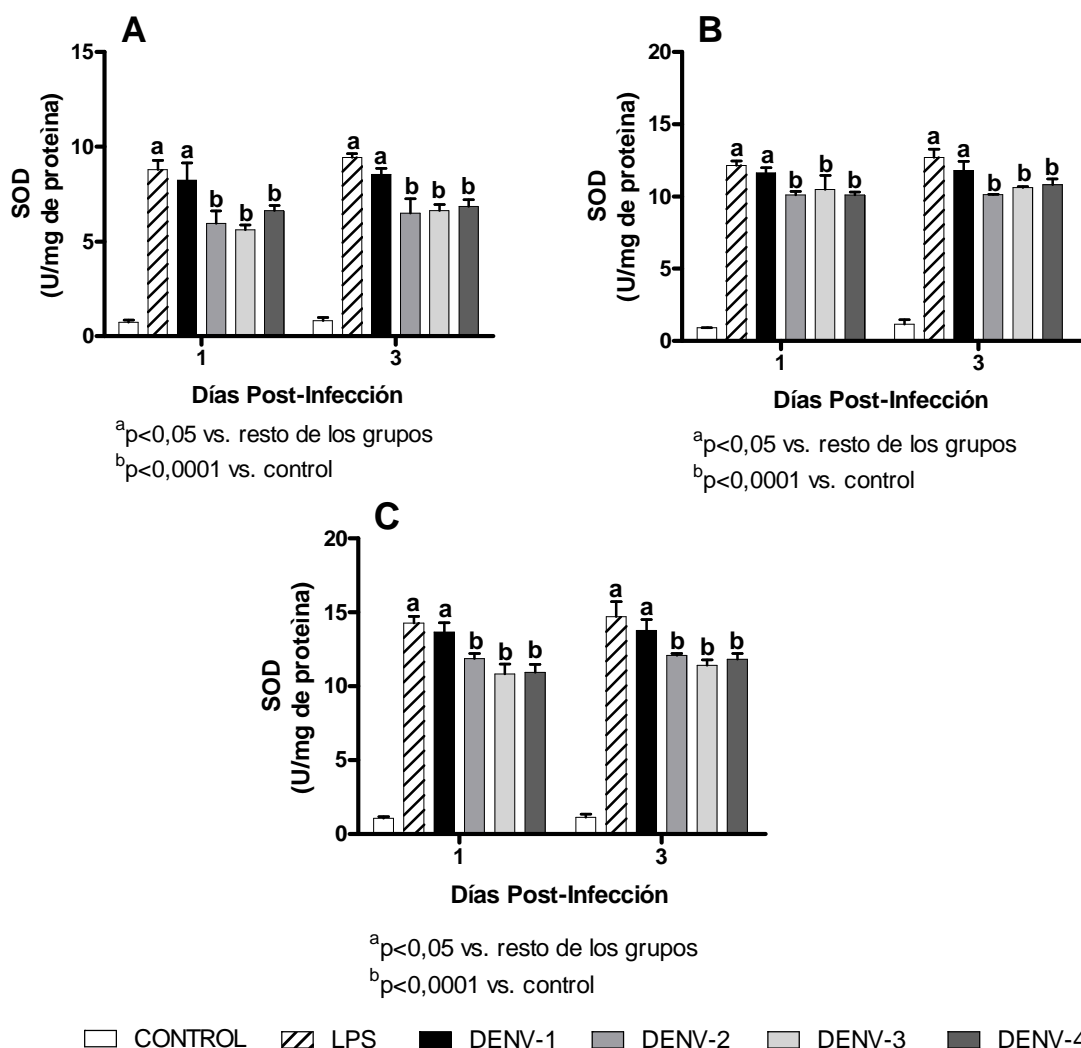


Figura 25. Actividad de SOD en lisados de cultivo de monocitos estratificados por edad, infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. Las concentraciones se determinaron a través de la medición de la actividad enzimática en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$), ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

En relación a la actividad de SOD en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y bajo estímulo con LPS a diferentes días PI, se observó que los niveles de esta enzima se incrementaron ($p < 0,01$) en los monocitos infectados por DENV-1 y DENV-2 y estimulados con LPS en ancianos con respecto a los observados en neonatos y adultos a los días 1 y 3 PI. Por otra parte, los monocitos de adultos y ancianos infectados por DENV-3 y DENV-4, difieren significativamente ($p < 0,05$) de los neonatos tanto al primero como al tercer día PI (Figura 26).

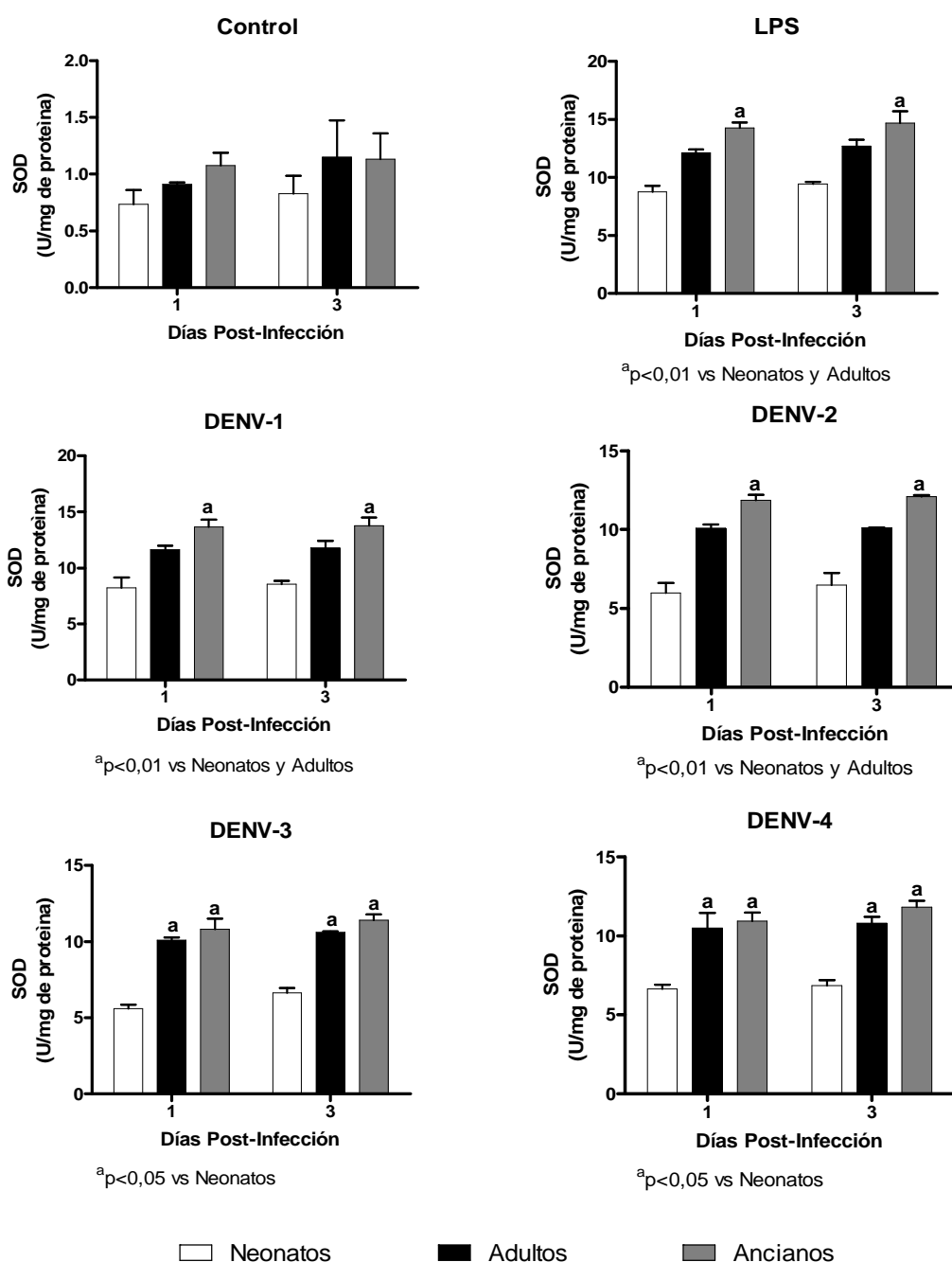


Figura 26. Actividad de SOD en lisados de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección Las concentraciones se determinaron a través de la medición de la actividad enzimática en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Al analizar las concentraciones de GSH relacionadas con el serotipo viral infectante en lisados celulares de monocitos estratificados por edad, infectados experimentalmente por serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días PI (1 y 3) se observó que al primer día se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos infectados con LPS (Neonatos: $10,53 \pm 0,502$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $15,43 \pm 0,557$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Ancianos: $13,64 \pm 0,79$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y DENV-4 (Neonatos: $9,76 \pm 0,237$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $14,74 \pm 0,2$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Ancianos: $12,47 \pm 0,084$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al compararse con el resto de los grupos (**Neonatos**: Control= $2,41 \pm 1,313$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $5,59 \pm 1,313$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $6,22 \pm 1,094$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-3= $6,81 \pm 0,26$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Adultos**: Control= $4,65 \pm 0,599$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $11,53 \pm 1,094$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $12,04 \pm 0,835$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-3= $12,11 \pm 0,475$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Ancianos**: Control= $3,29 \pm 0,577$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $9,92 \pm 0,32$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $9,69 \pm 0,298$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-3= $9,92 \pm 0,12$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Además, hubo incremento en la actividad ($p < 0,0001$) en los monocitos infectados por los serotipos 1, 2 y 3 al compararse con el grupo control en los diferentes grupos etarios.

Al tercer día PI, los resultados fueron similares, donde los niveles de GSH en sobrenadantes de lisados celulares de monocitos bajo estímulo con LPS (Neonatos: $10,61 \pm 0,983$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $19,38 \pm 0,533$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y Ancianos: $14,54 \pm 0,491$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y DENV-4 (Neonatos: $10,39 \pm 0,437$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $17,97 \pm 0,535$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Ancianos: $13,07 \pm 0,521$

$\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) en neonatos, adultos jóvenes y ancianos fueron más altos ($p<0,05$) que el resto de los grupos (**Neonatos**: Control= $3,17\pm0,656 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $6,63\pm0,679 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $7,92\pm0,437 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-3= $8,06\pm0,315 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Adultos**: Control= $6,14\pm0,712 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $12,67\pm1,532 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $14,02\pm0,375 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-3= $14,64\pm0,413 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Ancianos**: Control= $4,4\pm0,552 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $10,71\pm0,342 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $11,29\pm0,123 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-3= $11,11\pm0,165 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Además, se encontró incremento ($p<0,001$) en los monocitos infectados por los serotipos 1, 2 y 3 del dengue, al compararse con el control tanto en neonatos, adultos jóvenes y ancianos.

Sin embargo, no existen diferencias estadísticas en los grupos estudiados en relación a los días PI en las concentraciones de GSH en monocitos de neonatos y ancianos, a excepción de los niveles obtenidos en adultos infectados con LPS ($p<0,001$), DENV-3 ($p<0,01$) y DENV-4 ($p<0,001$) los cuales se encontraron más elevados al tercer día (Figura 27).

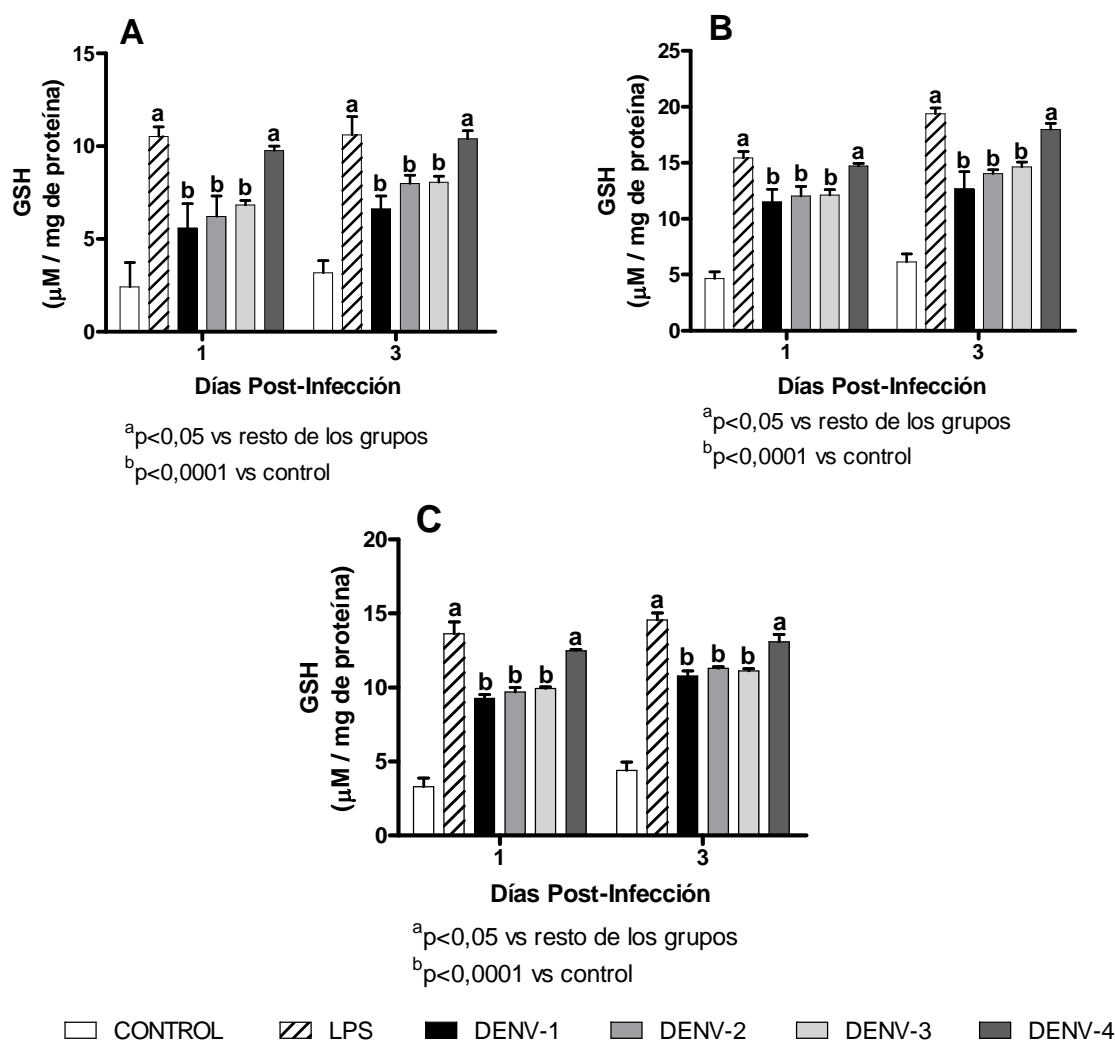


Figura 27. Concentraciones de GSH en lisados de cultivo de monocitos estratificados por edad, infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. Las concentraciones se determinaron a través de la medición de la actividad enzimática en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Por su parte, las concentraciones de GSH en lisados celulares de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente por serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días PI, mostraron que las concentraciones del control en adultos se incrementaron ($p<0,01$) con respecto a la de los neonatos al tercer día PI.

En monocitos de adultos y ancianos bajo estímulo con LPS, las concentraciones de GSH se encontraron más elevadas ($p<0,01$) que en los neonatos al día 1 PI. Mientras que al día 3, los monocitos de adultos difieren ($p<0,001$) de los neonatos y ancianos, y los ancianos se incrementaron ($p<0,01$) con respecto a los neonatos.

En cuanto a los monocitos tanto de adultos como de ancianos infectados por DENV-1, se evidenció elevación ($p<0,01$) de las concentraciones al compararse con la de los neonatos en ambos días PI. Mientras que en los infectados por DENV-2, 3 y 4, los adultos respondieron mejor ($p<0,01$) que los ancianos y que los neonatos. A su vez, las concentraciones en ancianos resultaron más incrementadas ($p<0,01$) que en los neonatos al día 1 y 3 PI (Figura 28).

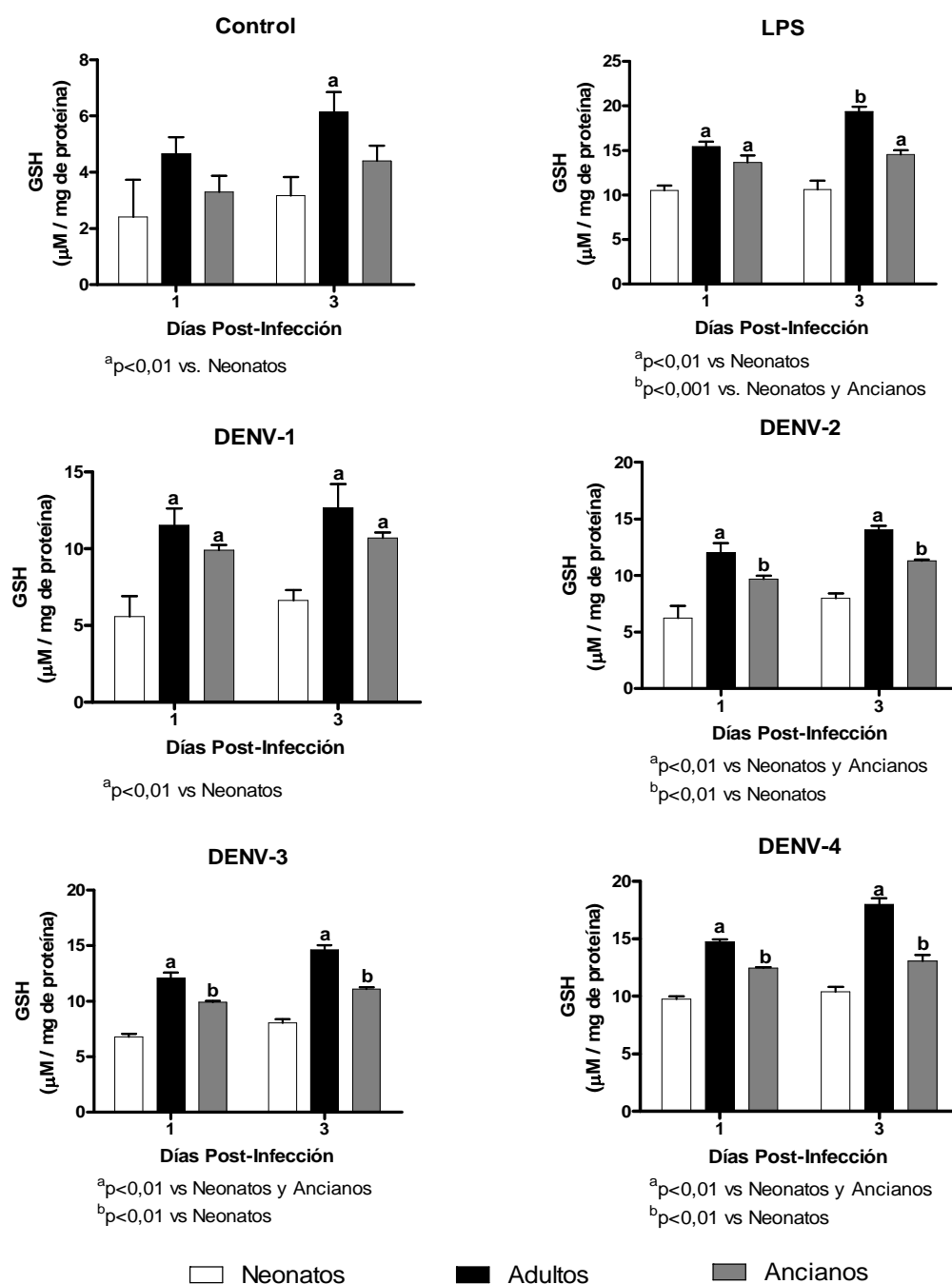


Figura 28. Concentraciones de GSH en lisados de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Las concentraciones se determinaron a través de la medición de la actividad enzimática en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$), ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). Los datos representan $\bar{X} \pm \text{DE}$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.3.4.- Concentraciones de NO.

Al analizar las concentraciones de NO de acuerdo al serotipo viral infectante en sobrenadantes de monocitos estratificados por edad, estimulados con LPS e infectados experimentalmente por serotipos de virus dengue a diferentes días PI (1 y 3) se observó que al primer día se incrementaron ($p<0,01$) las concentraciones en los monocitos con LPS (Neonatos: $10,11\pm0,694$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $19,94\pm0,604$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Ancianos: $17,38\pm0,464$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y con DENV-2 (Neonatos: $7,63\pm0,535$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $18,62\pm0,099$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Ancianos: $16,3\pm0,286$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al compararse con el resto de los grupos estudiados (**Neonatos:** Control= $0,37\pm0,068$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $5,54\pm0,305$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $5,11\pm0,124$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $5,77\pm0,358$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Adultos:** Control= $3,81\pm0,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $12,46\pm1,139$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $12,12\pm1,682$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $13,2\pm0,553$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Ancianos:** Control= $2,054\pm0,052$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $11,23\pm0,208$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $11,06\pm0,27$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $12,71\pm0,317$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Además, se encontraron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre los monocitos infectados por los con respecto al grupo control en todos los grupos etarios.

Al tercer día PI, los niveles de NO en sobrenadantes de cultivo de monocitos bajo estímulo con LPS (Neonatos: $11,04\pm0,564$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $22,42\pm0,91$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y Ancianos: $18,65\pm0,856$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) e infectados por DENV-2 (Neonatos: $8,3\pm0,045$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos:

19,73±0,173 μ M/mg de proteína, Ancianos: 17,95±0,047 μ M/mg de proteína) en neonatos, adultos jóvenes y ancianos fueron más altos ($p<0,01$) que el resto de los grupos (**Neonatos**: Control= 0,9±0,069 μ M/mg de proteína, DENV-1= 6,68±0,259 μ M/mg de proteína, DENV-3= 6,73±0,236 μ M/mg de proteína y DENV-4= 6,27±0,047 μ M/mg de proteína. **Adultos**: Control= 5,34±1,309 μ M/mg de proteína, DENV-1= 14,44±0,31 μ M/mg de proteína, DENV-3= 14,11±0,468 μ M/mg de proteína y DENV-4= 15,27±0,621 μ M/mg de proteína. **Ancianos**: Control= 3,88±0,1 μ M/mg de proteína, DENV-1= 12,96±0,056 μ M/mg de proteína, DENV-3= 12,68±0,308 μ M/mg de proteína y DENV-4= 14,68±0,312 μ M/mg de proteína). Además, se aumento en las concentraciones de NO ($p<0,0001$) en los monocitos infectados por los serotipos 1, 3 y 4 del dengue, al compararse con el grupo control tanto en neonatos, adultos jóvenes y ancianos. Sin embargo, los sobrenadantes de monocitos de ancianos infectados con DENV-4 se incrementaron ($p<0,01$) con respecto a los serotipos 1 y 3 del dengue al tercer día PI.

No existen diferencias estadísticas en las concentraciones de NO en monocitos cultivados de neonatos, adultos jóvenes y ancianos en los grupos estudiados en relación a los días PI (Figura 29).

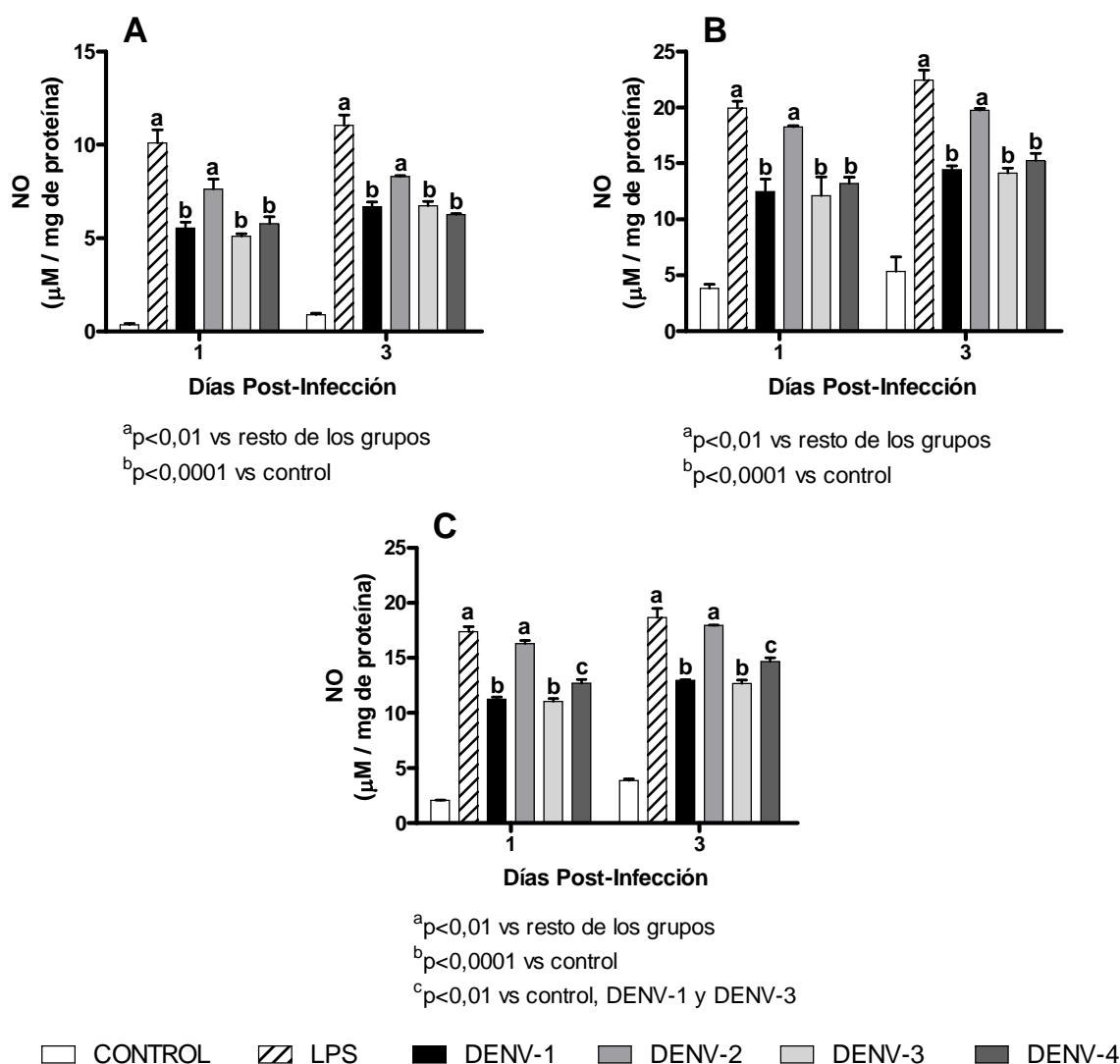


Figura 29. Concentraciones de NO en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad, infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. La concentraciones se determinaron mediante un ensayo de diazotización basado en la reacción de Griess en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$), ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). Los datos representan $\text{X} \pm \text{DE}$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

Las concentraciones de NO en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días PI, mostraron que las concentraciones en el grupo control fueron más elevadas ($p<0,01$) en los adultos al compararse con la de los neonatos a los días 1 y 3 PI.

En relación a los monocitos de adultos y ancianos bajo estímulo con LPS difieren ($p<0,01$) de los neonatos al día 1 PI. Mientras que al día 3, los adultos indujeron la mayor producción de NO ($p<0,05$) que los neonatos y ancianos. a su vez, las concentraciones en ancianos resultaron más altas ($p<0,01$) que las obtenidas en neonatos.

Con respecto a los 4 serotipos del dengue, los niveles obtenidos en adultos y ancianos resultaron incrementados ($p<0,001$) con relación a los neonatos, en ambos días PI (Figura 30).

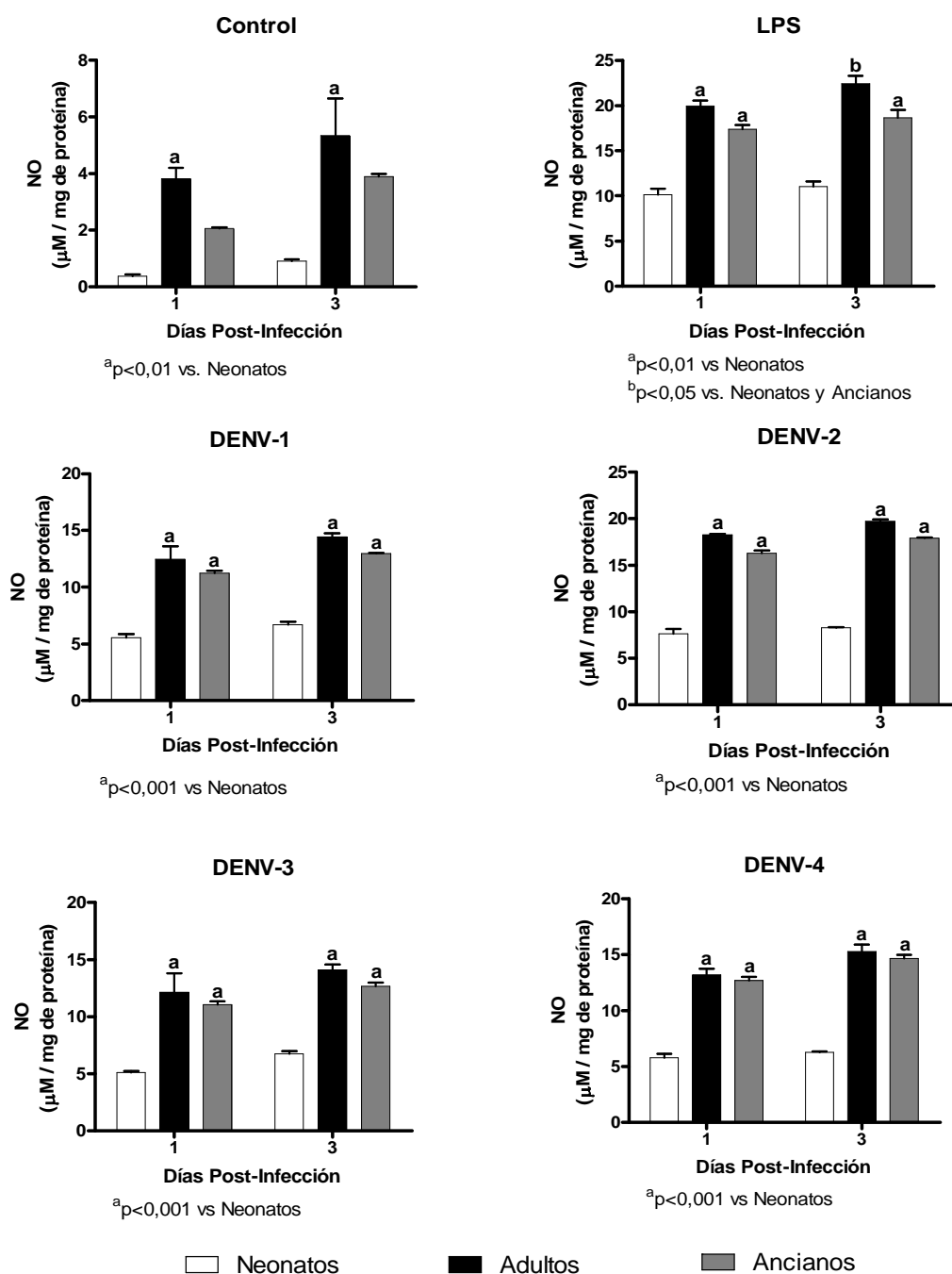


Figura 30. Concentraciones de NO en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. La concentraciones se determinaron mediante un ensayo de diazotización basado en la reacción de Griess en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$), ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). Los datos representan $\bar{X} \pm \text{DE}$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.3.5.- Concentraciones de MDA.

En cuanto a las concentraciones de MDA con el serotipo viral infectante en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad, estimulados con LPS e infectados experimentalmente por serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días PI (1 y 3), se observó que al primer día las concentraciones se elevaron ($p < 0,01$) en los grupos con LPS (Neonatos: $4,63 \pm 0,336$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $8,19 \pm 0,676$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Ancianos: $6,95 \pm 0,093$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), al compararse con el resto de los grupos estudiados (**Neonatos**: Control= $0,19 \pm 0,038$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $2,67 \pm 0,051$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $3,18 \pm 0,141$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $2,51 \pm 0,379$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $3,08 \pm 0,083$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Adultos**: Control= $0,75 \pm 0,039$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $5,29 \pm 1,151$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $7,07 \pm 0,061$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $5,24 \pm 0,068$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $7,03 \pm 0,117$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Ancianos**: Control= $0,31 \pm 0,012$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $4,1 \pm 0,038$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $5,23 \pm 0,076$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $3,84 \pm 0,063$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $5,14 \pm 0,171$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los monocitos infectados por los serotipos 1 y 3 al compararse con el grupo control. Así como los infectados por DENV-2 y 4 resultaron más elevados ($p < 0,05$ en neonatos, $p < 0,01$ en adultos y ancianos) que los serotipos 1 y 3 del dengue en los diferentes grupos etarios.

Al tercer día PI, los niveles de MDA en sobrenadantes de monocitos estimulados con LPS (Neonatos: $5,8 \pm 0,513$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, Adultos: $9 \pm 0,662$

$\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y Ancianos: $7,85 \pm 0,19 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) en neonatos, adultos jóvenes y ancianos fueron más altos ($p < 0,01$) que el resto de los grupos (**Neonatos**: Control= $0,34 \pm 0,006 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $2,92 \pm 0,048 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $3,78 \pm 0,289 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $2,86 \pm 0,06 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $3,63 \pm 0,114 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Adultos**: Control= $0,82 \pm 0,064 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $5,65 \pm 0,269 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $7,69 \pm 0,256 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $5,77 \pm 0,058 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $7,26 \pm 0,105 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. **Ancianos**: Control= $0,49 \pm 0,006 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-1= $4,46 \pm 0,079 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-2= $5,53 \pm 0,128 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, DENV-3= $4,39 \pm 0,026 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y DENV-4= $5,7 \pm 0,122 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los monocitos infectados por los serotipos 1 y 3 al compararse con el grupo control. Mientras que los monocitos infectados por DENV-2 y 4 resultaron diferentes ($p < 0,05$) en neonatos, $p < 0,01$ en adultos y ancianos a los virus 1 y 3 del dengue en los diferentes grupos etarios.

Sin embargo, no existen diferencias estadísticas en las concentraciones de NO en monocitos de neonatos, adultos jóvenes y ancianos en los grupos estudiados en relación a los días PI, a excepción de los niveles obtenidos en neonatos ($p < 0,0001$), adultos jóvenes ($p < 0,01$) y ancianos ($p < 0,0001$) bajo estímulo con LPS, los cuales resultaron más elevados al tercer día (Figura 31).

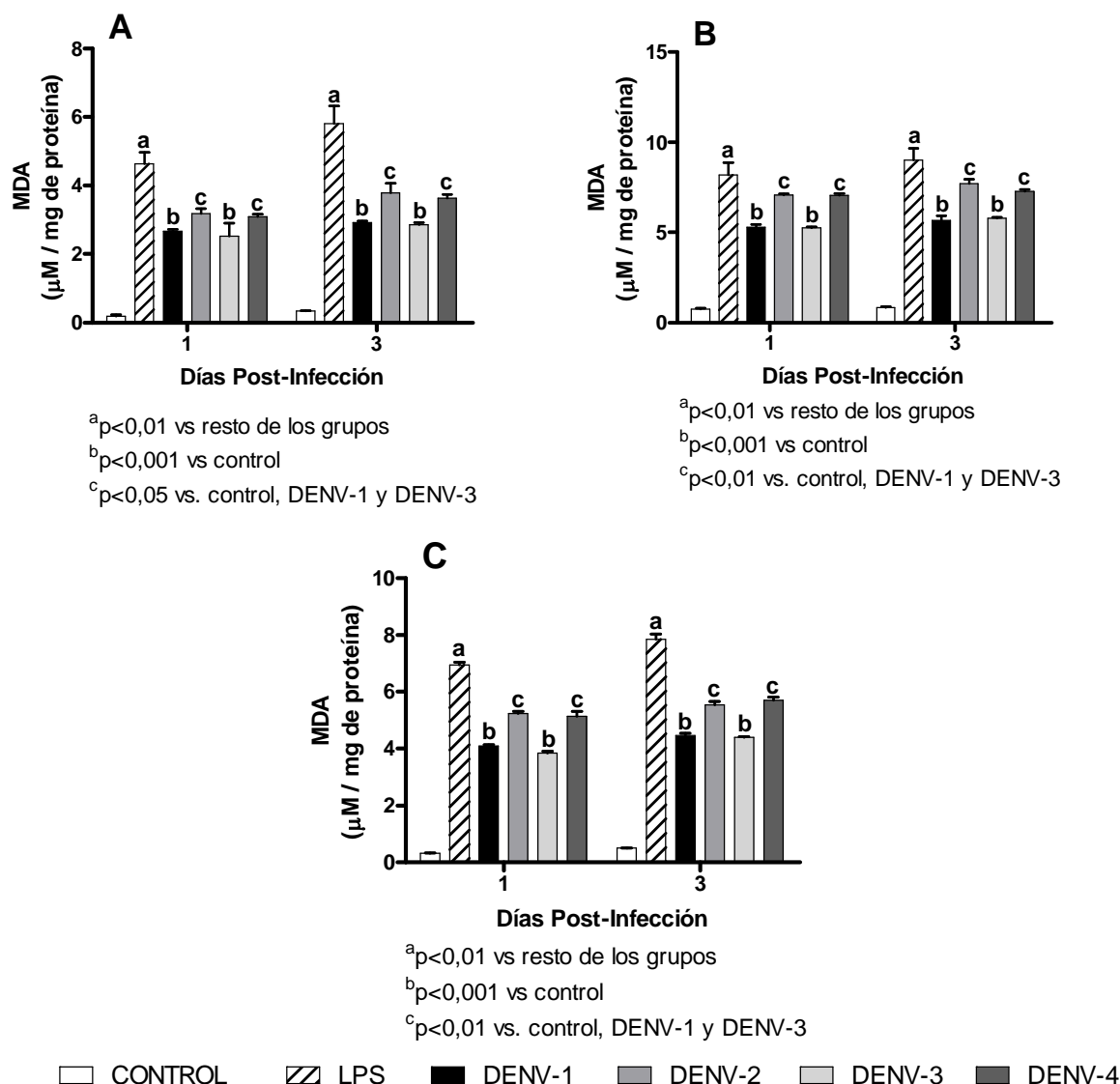


Figura 31. Concentraciones de MDA en sobrenadantes de cultivo de monocitos estratificados por edad, infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. (A) Neonatos, (B) Adultos, (C) Ancianos. La concentración se determinó por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10), ancianos (n=10) y controles (n=10). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

A su vez, las concentraciones de MDA en los sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y bajo estímulo con LPS a diferentes días PI, mostraron que en el control se encontraban elevadas ($p < 0,001$) en adultos con respecto a neonatos a los días 1 y 3 PI. En los monocitos de adultos estimulados con LPS e infectados con los 4 serotipos del DENV fueron mayores ($p < 0,01$) que en la de los neonatos al día 1 y 3 PI. Por su parte, los niveles obtenidos en ancianos resultaron incrementados ($p < 0,001$) con relación a los de los neonatos (Figura 32).

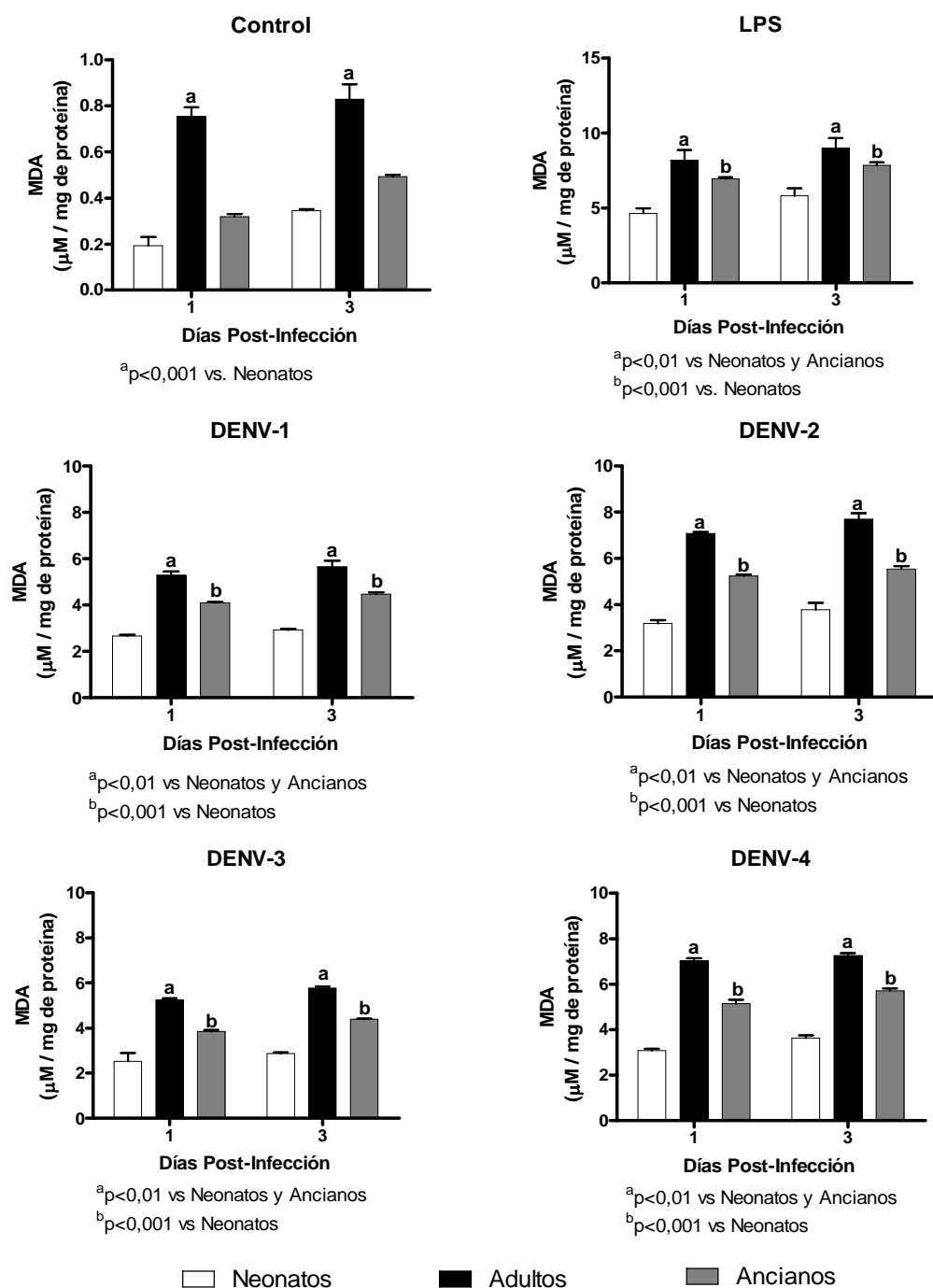


Figura 32. Concentraciones de MDA en sobrenadantes de cultivo de monocitos de neonatos, de adultos jóvenes y de ancianos infectados experimentalmente con serotipos de virus dengue y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. La concentración se determinó por ELISA en monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$), ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). Los datos representan $X \pm \text{DE}$ de 3 ensayos. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV.4.- Apoptosis en cultivo de monocitos estimulados con LPS e infectados por los serotipos del virus dengue a diferentes días post-infección.

IV.4.1.- Apoptosis en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos.

Al evaluar el efecto inductor de apoptosis por DENV en cultivos de monocitos procedentes de individuos sanos, se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en el número de monocitos apoptóticos en los cultivos de neonatos infectados (1^{er} día PI: LPS= $55,36 \pm 3,545\%$, DENV-1= $57,65 \pm 3,515\%$, DENV-2= $58,36 \pm 1,569\%$, DENV-3= $55,63 \pm 2,587\%$ y DENV-4= $57,12 \pm 5,332\%$; y 3^{er} día PI: LPS= $69,87 \pm 2,369\%$, DENV-1= $76,84 \pm 5,321\%$, DENV-2= $75,54 \pm 3,859\%$, DENV-3= $74,89 \pm 3,811\%$ y DENV-4= $76,77 \pm 3,854\%$) cuando se compararon con los controles no infectados (1^{er} día PI= $8,98 \pm 2,584\%$ y 3^{er} día PI= $9,845 \pm 3,156\%$). Además, se evidenció que el porcentaje de células apoptóticas es mayor ($p < 0,01$) al día 3 PI, con respecto al primero, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 33).

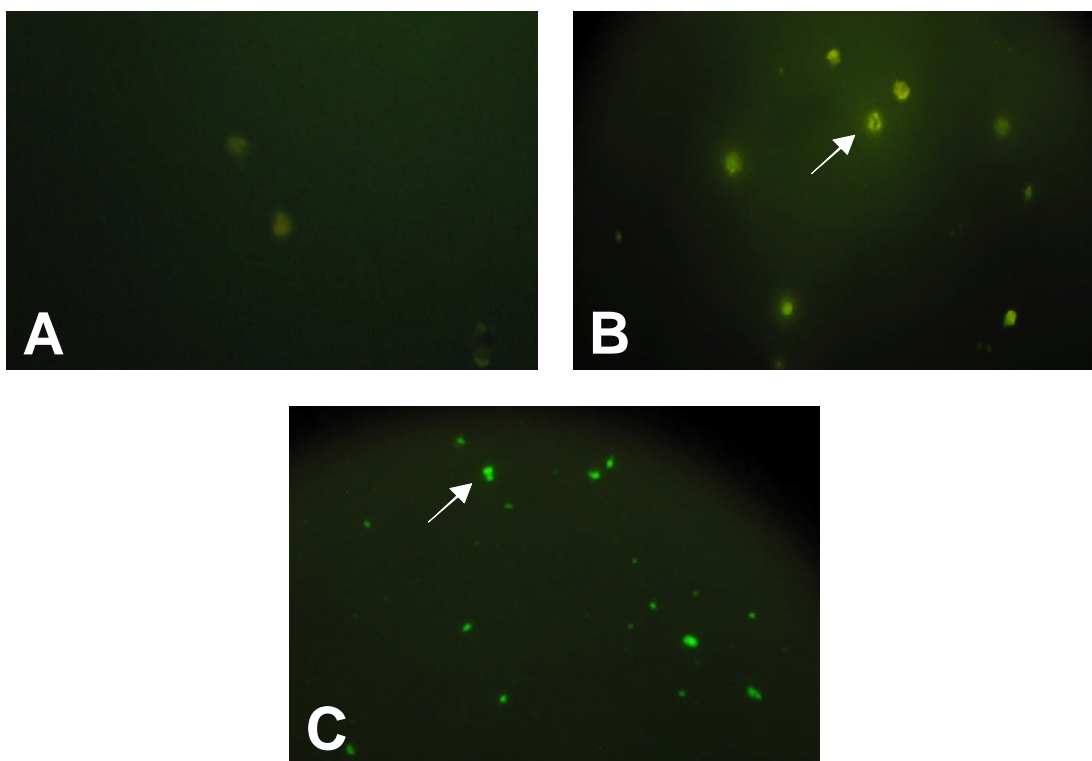
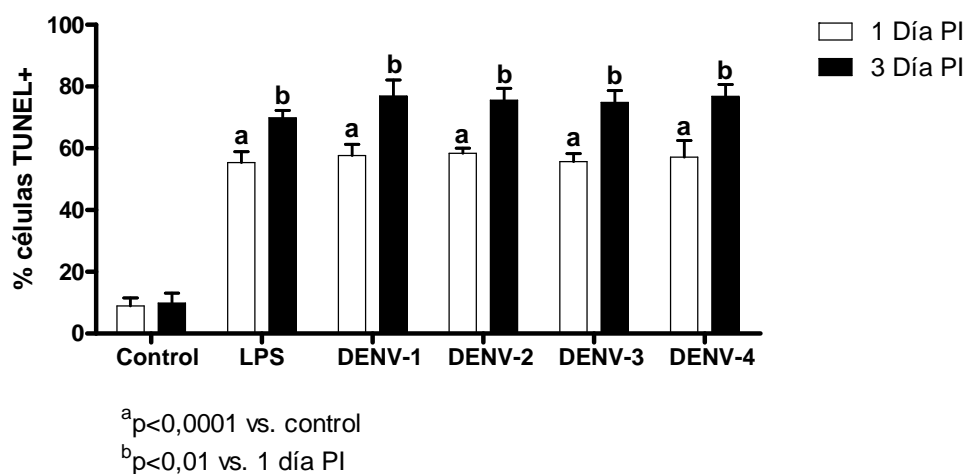


Figura 33. Frecuencia de células TUNEL positivas (apoptosis) en cultivo de monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos infectados con serotipos del virus y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Los datos representan $\bar{X} \pm DS$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Se utilizaron monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$) y acianos ($n=10$) y controles ($n=10$). **La microfotografía representa apoptosis en monocitos de individuos sanos: A)** Monocitos procedentes de individuos sanos negativo a TUNEL. **B)** Monocitos de individuo sano tratados con LPS (50 ng/ml). **C)** Monocitos infectados experimentalmente con DENV. Las flechas señalan células positivas a la reacción de TUNEL.

En relación al número de monocitos apoptóticos en los cultivos de adultos infectados, se hallaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en (1^{er} día PI: LPS= $50,36 \pm 2,563\%$, DENV-1= $52,12 \pm 3,548\%$, DENV-2= $51,26 \pm 4,856\%$, DENV-3= $51,85 \pm 2,542\%$ y DENV-4= $52,85 \pm 5,819\%$; y 3^{er} día PI: LPS= $67,85 \pm 5,635\%$, DENV-1= $73,85 \pm 6,854\%$, DENV-2= $70,23 \pm 7,985\%$, DENV-3= $71,65 \pm 4,784\%$ y DENV-4= $72,74 \pm 5,695\%$) cuando se compararon con los controles no infectados (1^{er} día PI= $7,08 \pm 1,856\%$ y 3^{er} día PI= $11 \pm 2,856\%$). Además, se evidenció que el porcentaje de células apoptóticas es mayor ($p < 0,01$) al día 3 PI, en relación al primero, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 34).

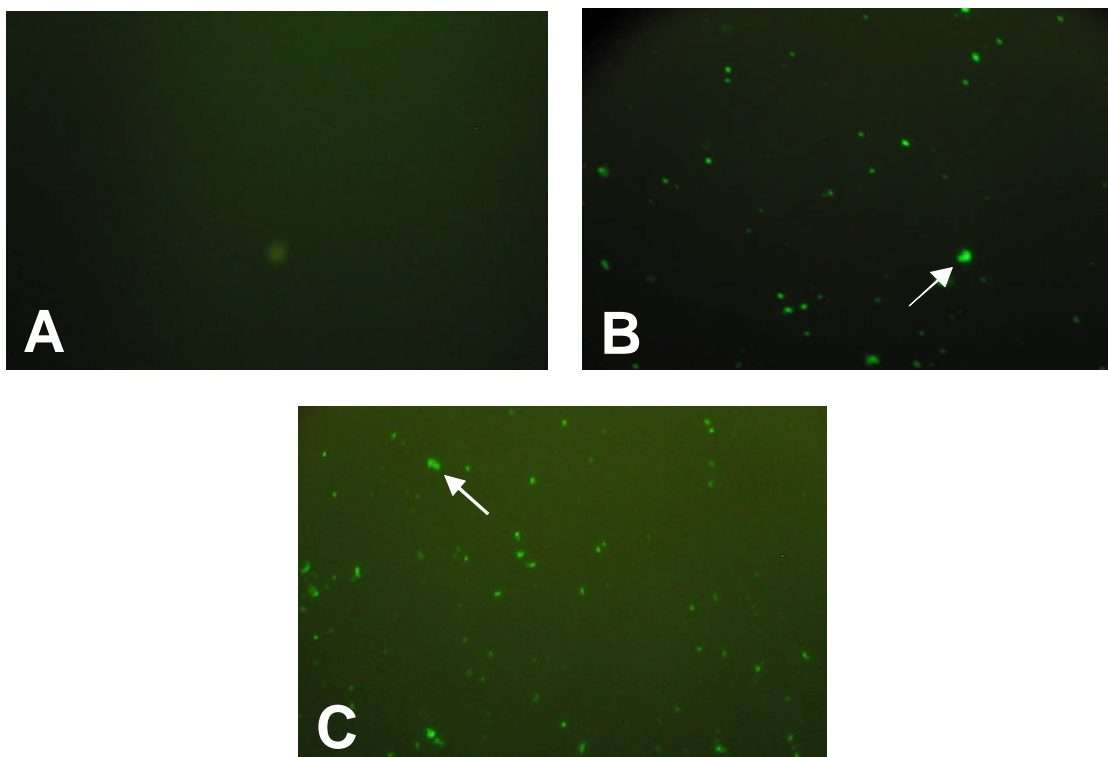
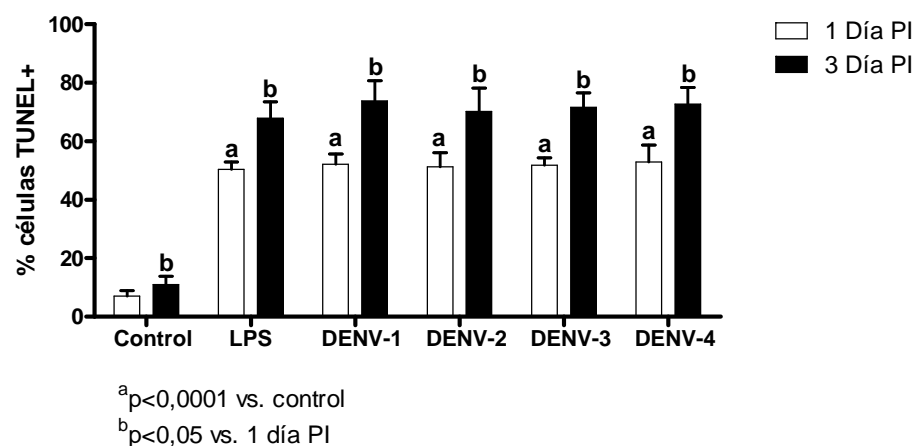


Figura 34. Frecuencia de células TUNEL positivas (apoptosis) en cultivo de monocitos provenientes de sangre periférica de adultos jóvenes infectados con serotipos del virus y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. *p<0,001 con respecto al grupo control. Los datos representan $X \pm DS$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Se utilizaron monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos (n=10) y de sangre periférica de adultos jóvenes (n=10) y acianos (n=10) y controles (n=10). **La microfotografía representa apoptosis en monocitos de individuos sanos:** **A)** Monocitos procedentes de individuos sanos negativo a TUNEL. **B)** Monocitos de individuo sano tratados con LPS (50 ng/ml). **C)** Monocitos infectados experimentalmente con DENV. Las flechas señalan células positivas a la reacción de TUNEL.

Mientras que el número de monocitos apoptóticos en los cultivos de ancianos infectados, se hallaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en (1^{er} día PI: LPS= $52,63 \pm 2,845\%$, DENV-1= $50,36 \pm 3,212\%$, DENV-2= $53,37 \pm 3,381\%$, DENV-3= $50,87 \pm 3,965\%$ y DENV-4= $51,965 \pm 4,912\%$; y 3^{er} día PI: LPS= $68,985 \pm 4,899\%$, DENV-1= $70,87 \pm 4,965\%$, DENV-2= $69,84 \pm 5,896\%$, DENV-3= $72,62 \pm 6,143\%$ y DENV-4= $73,36 \pm 7,321\%$) cuando se compararon con los controles no infectados (1^{er} día PI= $6,98 \pm 1,315\%$ y 3^{er} día PI= $12,44 \pm 1,856\%$). Además, se evidenció que el porcentaje de células apoptóticas es mayor ($p < 0,01$) al día 3 PI, en relación con el primero, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 35).

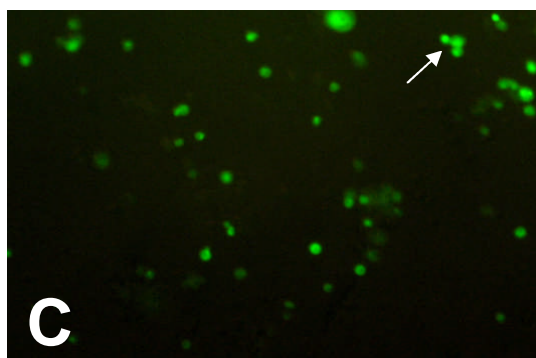
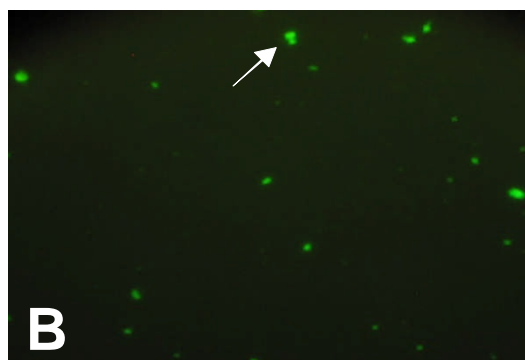
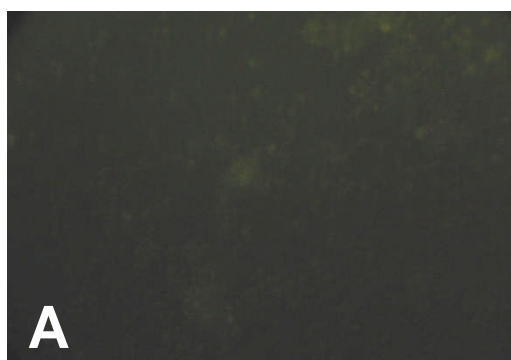
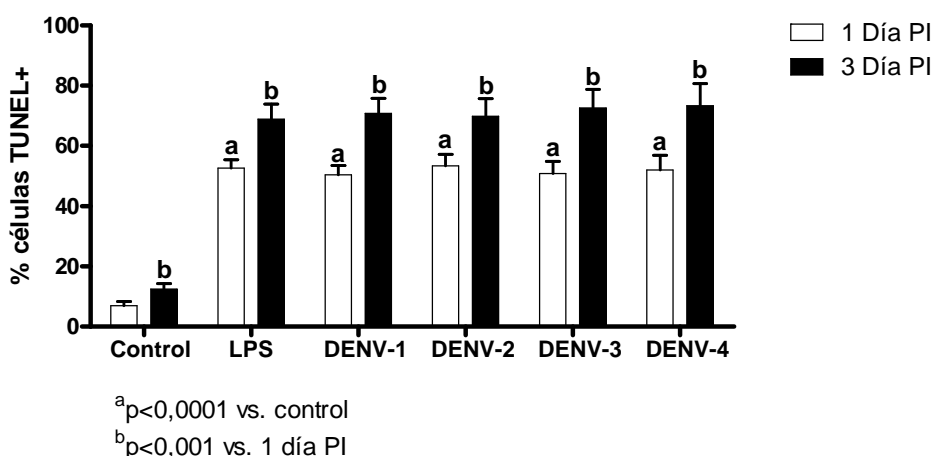


Figura 35. Frecuencia de células TUNEL positivas (apoptosis) en cultivo de monocitos provenientes de sangre periférica de ancianos infectados con serotipos del virus y estimulados con LPS a diferentes días post-infección. Los datos representan $\bar{X} \pm DS$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. Se utilizaron monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical de neonatos ($n=10$) y de sangre periférica de adultos jóvenes ($n=10$) y ancianos ($n=10$) y controles ($n=10$). **La microfotografía representa apoptosis en monocitos de individuos sanos: A)** Monocitos procedentes de individuos sanos negativo a TUNEL. **B)** Monocitos de individuo sano tratado con LPS (50 ng/ml). **C)** Monocitos infectados experimentalmente con DENV. Las flechas señalan células positivas a la reacción de TUNEL.

V. DISCUSIÓN

V.1- Respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con dengue. Asociaciones clínicas.

En nuestro trabajo hemos investigado la intensidad y el patrón de respuesta secretora de mediadores inflamatorios inducidos por el DENV y la evolución clínica en pacientes con dengue. Se decidió estudiar la respuesta inflamatoria al DENV con énfasis en el tipo de infección y la severidad de la enfermedad.

Se dispuso estudiar el nivel circulante de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , dado que son mediadores inflamatorios claves e importantes en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. También, con la finalidad de obtener un análisis del funcionamiento del sistema inmunitario y del estado inflamatorio en conjunto, estudiamos las proteínas del complemento, proteína c reactiva y óxido nítrico.

V.1.1.- Citoquinas pro-inflamatorias.

La patogénesis del dengue no está totalmente esclarecida. Durante el presente estudio se analizaron las concentraciones séricas de TNF- α , IL-1 β e IL-6, en vista que estas citoquinas han sido relevantes en epidemias de dengue en Tahití (Kuno *et al.*, 1994; Hober *et al.*, 1993). En este trabajo fue observada elevación del TNF- α tanto en DC como en DH, predominantemente en este último. La elevación prolongada y significativa de esta citoquina pro-inflamatoria durante la infección por dengue sugiere su papel en esta enfermedad. Nuestros resultados pueden relacionar la presencia de éstas con la gravedad de la enfermedad, al igual que otros autores, quienes han reportado relación del TNF- α con la severidad, y han descrito

incremento significativo en las concentraciones de TNF- α en pacientes con DH (Chakravarti *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2001). Estudios previos también han demostrado incremento del TNF- α y de la IL-6 en pacientes con DH, sugiriendo la importancia de estas citoquinas en causar permeabilidad vascular incrementada y choque durante la infección por virus dengue (King *et al.*, 2000). La semejanza de nuestros resultados con los reportados por otros, puede estar relacionada a una respuesta inmunitaria similar de nuestra población a la infección por el virus con respecto a otras (Halstead, 2006).

El TNF es uno de los más importantes mediadores, fundamental en el desencadenamiento de reacciones inflamatorias del sistema inmunitario innato (Hehlhans *et al.*, 2005). Nuestros hallazgos concuerdan con los descritos por Braga E. *et al.*, (2001); Chakravarti A y Kumaria R., (2006); y más recientemente por Levy A. *et al.*, (2010), al observar concentraciones séricas de TNF- α e IL-6 incrementadas en pacientes con dengue. Sin embargo, otros estudios describen concentraciones de TNF- α inalteradas en el Oeste de la India (Priyadarshini *et al.*, 2010) y en Gaboneses infectados con DENV-2 (Becquart *et al.*, 2010), quienes sugieren que las diferencias en las características de la población o en el estatus inmunológico previo, pudieran explicar estas discrepancias.

Se han descrito concentraciones altas de la IL-6 en las etapas tempranas del dengue (Becquart *et al.*, 2010) y asociadas con la severidad de la enfermedad (Juffrie *et al.*, 2001). Nuestros resultados muestran concentraciones de IL-6 séricas incrementadas, sugiriendo la participación de ésta en el progreso de la hemorragia y

síndrome de choque. A este respecto, la IL-6 puede afectar las células endoteliales incrementando la permeabilidad vascular, la endocitosis, y la transcitosis (**Duchini et al., 1996**). Además, la IL-6 podría tener un papel proinflamatorio al ser quimiotáctica para leucocitos y permitir su reclutamiento durante las reacciones inflamatorias (**Romano et al., 1997**). Por lo tanto, la secreción local de IL-6 por monocitos infectados con DENV puede aumentar el número de leucocitos a nivel tisular con el potencial de producir efectos deletéreos en otras células como las endoteliales y estar involucrada en las alteraciones hemorrágicas vistas en el DH/SCD. Tanto los valores de TNF- α como de IL-6 estuvieron relacionados con el grado del DH, sugiriendo la relación del incremento de estas citoquinas con la gravedad del dengue hemorrágico, hallazgos que concuerdan con los obtenidos por otros autores recientemente (**Levy A. et al., 2010; Bozza FA., 2008**).

Estudios previos han demostrado que el TNF- α y la IL-6 están asociados con la severidad de la enfermedad en la infección por dengue, mientras que las concentraciones de IL-1 β no están asociadas a la severidad de la enfermedad (**Levy et al., 2010; Kuno et al., 1994; Hober et al., 1993**). Estos datos coinciden con nuestros hallazgos, en donde los niveles de IL-1 β en el suero de los pacientes con DH no se encontraron elevados, no obstante, se encontró incremento de TNF- α e IL-6, sugiriendo poca relevancia de la IL-1 β durante esta enfermedad.

V.1.2.- Proteínas del Complemento C3 y C4.

La sobreproducción de citoquinas por células infectadas por DENV o por linfocitos activados es ampliamente estudiada por ser tan crítica (Avirutnam *et al.*, 1998; Halstead, 1989), sin embargo, la posible relevancia del complemento no ha recibido atención desde 1973 (Bokisch *et al.*, 1973). En nuestro estudio se encontró disminución de la concentración de C3 en los pacientes con dengue sugiriendo consumo posiblemente vinculado al proceso de formación de complejos inmunitarios, este efecto puede estar relacionado con el serotipo viral, en vista que la mayor disminución de C3 se observó en pacientes infectados por los virus DENV-2 y DENV-4. Las concentraciones de C4 se mantuvieron elevada de forma no significativa o normal, y siendo ésta parte de la vía clásica de activación del complemento, su persistencia en valores normales puede llevar a mayor consumo de C3 por estar más disponible a su fragmentación. Por otro lado, no se puede obviar que la disminución de C3 puede estar vinculada a la activación de la vía alterna del complemento (Walport, 2001). En estudios previos se ha demostrado que la activación del complemento es otra manifestación clínica importante en DH. Se ha reportado que los niveles de C3a y C5a, productos de activación del complemento, están correlacionados con la severidad del DH y las concentraciones de C3a y C5a alcanzan un pico al momento de la disminución cuando la pérdida de plasma llega a ser más aparente (Malasit, 1987), sugiriendo que la activación del complemento es también responsable de la patogénesis del dengue.

Es probable que el complemento se active por varios mecanismos en pacientes con DH, y que la activación del complemento también puede contribuir a la patogénesis de varias características clínicas, especialmente la pérdida de plasma. Además, se han reportado concentraciones elevadas de inmunocomplejos en pacientes con dengue (Ruangjirachuporn *et al.*, 1979). Los anticuerpos inducidos por infección pueden formar complejos inmunitarios con antígenos virales que pueden consumir el complemento (Hirsch, 1982). Además, la mayoría de los componentes del complemento se producen principalmente en el hígado y en monocitos/macrófagos (Colten, 1976), ambos conocidos como células blanco en la infección por DENV (Kou *et al.*, 2008). La infección puede disminuir los niveles de producción del complemento, posiblemente facilitando posteriores disminuciones de las concentraciones de éste en la circulación.

El mecanismo de activación del complemento en DH no está completamente entendido. Los complejos inmunitarios están presentes en los pacientes con DH, y se ha asumido que el complemento es activado por estos complejos. Estudios realizados proponen que la proteína NS1, la cual es la principal proteína no estructural del DENV, es un desencadenador importante para la activación del complemento. La expresión de NS1 sobre células infectadas puede causar unión de anticuerpos heterotípicos y no neutralizantes, así como ataque del complemento. Además, la NS1 liberada de células infectadas puede activar directamente el complemento en la fase fluida. Por lo que altas concentraciones de NS1 secretado y anticuerpos con reactividad cruzada pre-existentes, pueden también mediar la

activación del complemento. De hecho, se ha reportado que los monocitos y células endoteliales activan las vías clásica y alterna del complemento (Avirutham *et al.*, 2006; Malasit, 1987).

V.1.3.- Proteína C Reactiva.

La medición de las proteínas de fase aguda, tales como la PCR, es usada rutinariamente para el diagnóstico y monitoreo de diversas enfermedades inflamatorias e infecciosas (Gabay *et al.*, 1999). Aunque son pocos los estudios que describen el papel de la PCR en pacientes infectados con DENV, en nuestro estudio se encontraron concentraciones elevadas de esta proteína en pacientes con DH. Estos resultados sugieren una asociación entre las concentraciones de PCR y la severidad de la enfermedad, al mostrar aumento de esta proteína en el suero de pacientes con DH que presentaban infección secundaria. Este hecho contrasta con los resultados presentados por Juffrie *et al.*, (2001) y Bethell *et al.*, (1998), quienes demostraron que es improbable el uso clínico de la PCR en pacientes con dengue, debido a que hay concentraciones elevadas de esta proteína en individuos infectados con DENV, pero con ausencia de asociación con la severidad de la enfermedad.

La PCR es una proteína inducida por la IL-6 (Hack *et al.*, 1997). El hecho que ambos mediadores inflamatorios se encontraran elevados en pacientes con infección secundaria y que presentaban DH, sugiere que esta puede estar involucrada en la producción de la PCR durante la infección por dengue. La producción de PCR puede

estar asociada al serotipo viral, debido a que las mayores concentraciones de esta proteína fueron observadas durante la infección por el serotipo 2.

V.1.4.- Óxido Nítrico.

Las concentraciones de NO, se encontraron incrementadas en pacientes que experimentaron DC y DH, siendo mayor en pacientes con DC. Estos datos concuerdan con los reportados por otros autores (Neves-Souza, 2005; Valero *et al.*, 2002). La producción incrementada de NO en pacientes con DC es un hallazgo esperado, hecho que se le puede atribuir al efecto benéfico del NO en DC, el cual podría estar relacionado a un efecto antiviral de la molécula. Estudios previos muestran que el NO podría tener dicho efecto sobre las células infectadas por dengue, y a pesar que hay pocos reportes que describen las concentraciones de este radical en pacientes con dengue, se ha demostrado que este virus es capaz de inducir NO en cultivos de células esplénicas y de Kupffer (Añez *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2002; Marianneau *et al.*, 1999).

Los pacientes con DH también presentaron niveles elevados de NO cuando se compararon con los controles normales, siendo estos relacionados con el grado de severidad de la enfermedad, lo que sugiere que el NO participa en el cuadro del DH, lo cual sugiere que este radical puede no actuar como protector ante la infección viral. Además, se conoce por ser un potente radical oxidante que puede tener efectos deletéreos sobre la célula (Espina *et al.*, 2003).

V.2.- Efecto directo del DENV sobre la producción de citoquinas en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos.

Los Mo/Mq son los responsables de la difusión del virus después de su entrada en la dermis por la picadura del mosquito vector (Kou *et al.*, 2008). Estos se activan durante un proceso infeccioso, produciendo diversos mediadores pro-inflamatorios y pueden tener una activación amplificada durante la infección secundaria que llega a ser fuente intensa de producción de citoquinas. Varias investigaciones han seguido los pacientes durante la infección aguda para controlar su contenido de citoquinas en plasma encontrándose que el TNF- α está entre las detectadas por primera vez en los pacientes, así como en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (Bethell *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2001). En general, estos mediadores pueden promover la activación de plaquetas y células endoteliales, que conllevan a trombocitopenia, permeabilidad vascular, hipotensión y choque, como se observa en los casos graves de dengue (Fink *et al.*, 2006).

El origen del incremento del TNF durante la infección por dengue es un aspecto fisiopatológico importante. Algunos autores señalan que la infección por virus dengue induce una activación inmunitaria aberrante transitoria con una inversión de la relación de linfocitos T CD4+/CD8+ y una sobreproducción de citoquinas que afecta a los monocitos y las células endoteliales (Lei *et al.*, 2001). Así, Herbein y O'Brien (2000) refieren que los linfocitos T CD8+ específicos contra la proteína de la cápside del virus dengue producen TNF- α e IFN- γ , en respuesta a la

estimulación con DENV-2, y que esto pudiera contribuir en la inmunopatogénesis observada en la infección secundaria por este virus, a través de la citólisis directa y/o producción elevada de citoquinas. También se ha observado que las células T CD4+ y CD8+ reactivas al virus dengue producen predominantemente TNF- α , TNF- β y quimioquinas, incluyendo la proteína 1 β inhibidora de macrófagos, al interactuar con las células presentadoras de antígeno (CPA) infectadas por este virus, y que ello incrementa la eficiencia de la lisis de las células infectadas por dengue *in vitro* (Rothman, 2004). Este estudio demuestra que la interacción de los diferentes serotipos del virus dengue con el monocito es suficiente para inducir a estas células a producir TNF- α , y establece la posibilidad de su contribución en el incremento sérico de esta citoquina en los pacientes con DH. Aunado a esto y como posible causa de incremento de la infectividad del virus, el TNF- α no interfiere en la capacidad de replicación del virus dengue en el sistema Mo/M ϕ (Wati *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha descrito una relativa inmadurez e incapacidad funcional de los monocitos en recién nacidos y lactantes (Denton *et al.*, 2009, Pillay *et al.*, 1994) y un acúmulo de estrés oxidativo y estado pro-inflamatorio en los ancianos (Seidler *et al.*, 2010; Della Bella *et al.*, 2007; Rich *et al.*, 1993). Esta célula diana de la infección por dengue, y de relevancia patogénica en la enfermedad inducida por este virus, constituye un elemento importante en la respuesta innata del sistema inmunitario y en la inducción de la adaptativa. Los monocitos circulantes constituyen una población celular heterogénea por sus características fenotípicas y funcionales (Ziegler-Heitbrock

et al., 2010), y se ha demostrado que éstas características son diferentes a lo largo de las grandes fases de la vida de un individuo.

Teniendo en cuenta estas premisas, consideramos relevante analizar el impacto de la infección por el virus dengue en monocitos procedentes de controles sanos de diferentes edades. Incluimos un grupo de recién nacidos con análisis de los monocitos de la sangre de cordón umbilical y otros dos grupos de edad en adultez joven y de personas de más de 65 años, en las que estudiamos los monocitos circulantes de sangre periférica.

Nuestros resultados indican que los monocitos infectados por DENV secretan diversas citoquinas. Comprobamos el incremento significativo de la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β con respecto al grupo control. Observamos que el mayor aumento de éstas se producen en los monocitos de adultos al compararse con los de neonatos y ancianos, lo que demuestra una mayor susceptibilidad de los adultos a los mecanismos patogénicos inducidos por el virus dengue. Por lo tanto, es previsible plantear que el efecto de la infección por DENV podría estar relacionado a la edad del individuo.

V.3.- Efecto directo del DENV sobre la producción de antioxidantes (CAT, SOD y GSH), radicales libres (NO) y productos de la peroxidación lipídica (MDA) en cultivo de monocitos procedentes de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos.

La agresión oxidativa que producen las especies reactivas de oxígeno sobre las moléculas orgánicas se conoce como estrés oxidativo y es la consecuencia inevitable del metabolismo aerobio de las células. Los organismos cuentan con sistemas antioxidantes eficaces para contrarrestar la acción lesiva de los radicales oxigénicos que cuando se ven superadas por éstos sufren alteraciones de su función metabólica y de su viabilidad. Diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos y, especialmente aquellos de carácter degenerativo, se han visto implicados con la formación de especies reactivas en su mecanismo patogénico. El estrés oxidativo inicia y regula la transcripción y la activación de una larga serie de mediadores en otras células, que culminan en el mecanismo común de daño: apoptosis, necrosis, inflamación, regeneración de la respuesta inmunitaria, isquemia, vasculitis, expresión de genes alterados, y la prevalencia y la persistencia de una o más de estos aspectos pueden influir en la aparición de diferentes tipos de enfermedades (Yoshikawa, 2002).

Este hecho se ve resaltado en la infección por virus dengue. Aunque existen pocos estudios sobre el papel de estas moléculas en ésta infección, en la actualidad el estudio de los productos de oxidación molecular, se presenta como un aspecto

prometedor de la investigación biomédica en tanto que éstos podrían ser útiles como marcadores de la evolución clínica de esta enfermedad (**Cerdá et al., 2010**).

El sistema de defensa antioxidante de las células vivas, constituye un mecanismo adaptativo de gran relevancia. Numerosos estudios se han realizado para determinar si las defensas antioxidantes declinan con la edad. Estos estudios involucran mediciones de las enzimas y compuestos con funciones antioxidantes como CAT, SOD y GSH (**Rodríguez y Céspedes, 1999**).

Diferentes autores han demostrado que las concentraciones de GSH en varios tejidos de origen murino disminuyen significativamente con la edad (**Benzi et al., 1995; Sohal et al., 1990; Mo et al., 1995**). Además, se ha encontrado una disminución en la actividad CAT en *Drosophila* y mosca doméstica durante el envejecimiento (**Sohal et al., 1986 y 1990**). En cambio, en mamíferos, el comportamiento de esta enzima con la edad es diferente según el tejido; disminuye en riñón e hígado y tiende a aumentar en corazón y cerebro, donde disminuye marcadamente en las últimas etapas de la vida (**Benzi et al., 1995; Sohal et al., 1995; Mo et al., 1995**). Nuestros resultados demostraron incremento de estas enzimas en los sobrenadante de monocitos de adultos infectados con las cepas del dengue, y niveles más bajos en neonatos y ancianos, demostrándose que durante el envejecimiento hay un declinar en las defensas antioxidantes de la célula.

Resultados diferentes arrojaron los niveles de SOD en nuestro estudio, donde se encontró elevada en los sobrenadantes de monocitos de ancianos infectados por serotipos de dengue. Las marcadas diferencias entre los estudios referentes a la actividad o expresión SOD impiden arribar a una conclusión definitiva. Las referencias sobre el comportamiento de la actividad de esta enzima durante el envejecimiento son contradictorias. En numerosos estudios realizados no se encuentran cambios en la actividad o en la expresión con la edad, mientras que otros autores refieren disminución o aumento (Dahn *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1990; Gupta *et al.*, 1991; Warner *et al.*, 1994). Por ello, se cree que divergencias en los resultados en la determinación de la actividad SOD pueden ser causadas por diferencias entre especies, condiciones del hábitat y por procedimientos técnicos empleados. Sin embargo, no existen reportes del papel de esta enzima en la infección por dengue.

Varios autores indican que el NO puede inhibir la replicación viral (Bi *et al.*, 1995; Akarid *et al.*, 1995) y se ha demostrado que juega un papel en la transmisión de la señal supresora específica para el virus dengue (Khare *et al.*, 1997). Además, el NO ha sido involucrado en la inmunidad innata en contra de células infectadas por dengue (Lin *et al.*, 1998). Otro mecanismo benéfico del NO durante la infección por el virus dengue podría estar relacionado con la capacidad de la molécula de evitar la apoptosis al bloquear la infección viral de la célula. Ya que se ha demostrado que la muerte apoptótica después de una infección viral puede desencadenar procesos inflamatorios (Restifo, 2000). El efecto apoptótico del virus dengue ha sido reportado en células endoteliales infectadas (Avirutnam *et al.*, 1998; Marianneau *et al.*, 1998). El

efecto antiviral del NO no está restringido al DENV. Varios estudios han reportado este efecto en una lista extensa de virus, incluyendo Coronavirus del SRAS, hantavirus, el virus de Ross River, virus de estomatitis vesicular, virus de la fiebre hemorrágica Crimean-Congo, y miembros del género *Flavivirus*, incluyendo Encefalitis Japonesa (Klingstrom *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006; Chesler *et al.*, 2004; Keyaerts *et al.*, 2004; Lidbury *et al.*, 2000; Saxena *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1997; Bi *et al.*, 1995).

Aunque el MDA y NO están siendo utilizados con mayor frecuencia como marcadores biológicos confiables del estrés oxidativo, no han sido estudiados en infecciones causadas por dengue, ni mucho menos en grupos estratificados por edad.

V.4.- Efecto inductor/modulador del DENV sobre la apoptosis de monocitos de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos y ancianos.

La apoptosis es un tipo de muerte celular relacionada con procesos fisiológicos y patológicos, también es conocida como muerte celular programada (Marianneau *et al.*, 1998).

Los mecanismos de inducción de muerte por el virus en la célula infectada son diversos y entre ellos se incluye como relevante el de la inducción de la apoptosis. Nosotros analizamos la existencia o no de daño en los monocitos provenientes de

sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos jóvenes y ancianos, además evaluamos el impacto inductor del virus sobre los mismos, y la activación diferencial de los mecanismos antioxidantes de acuerdo a la edad y al serotipo viral infectante para determinar la causa principal del daño en estas células.

En nuestro estudio, la incubación de monocitos humanos con diferentes serotipos del virus dengue, demostró un incremento en el número de células apoptóticas. Los efectores de apoptosis en los cultivos pueden ser variables y trabajar en conjunto. El virus dengue es capaz de inducir apoptosis en monocitos (Levy *et al.*, 2010) y células endoteliales (Avirutnam *et al.*, 1998; Marianneau *et al.*, 1998) infectadas por dengue. Se han encontrado muchos virus capaces de inducir apoptosis en células infectadas (Courageot y Després, 2000; Roulston *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 1998). La evidencia muestra que la apoptosis puede jugar un papel clave en la respuesta innata a la infección por virus (Barber *et al.*, 2001; Hardwick *et al.*, 1998; Shen y Sheck, 1995). La apoptosis seguida de infección viral puede ser un mecanismo de defensa que rápidamente elimina células en las cuales el virus se replica, además previene la liberación de la progenie viral. Sin embargo, la apoptosis puede ser perjudicial al hospedador cuando las células son infectadas.

VI. CONCLUSIONES

En base a nuestro estudio de la respuesta inmunitaria/inflamatoria y oxidativa en pacientes con dengue y del estudio de los efectos patogénicos de las cepas del virus sobre monocitos de sujetos sanos, se concluye que:

1. Los pacientes con infección aguda presentan una significativa elevación sérica de las citoquinas (TNF- α e IL-6), que se relaciona con la gravedad del cuadro clínico, sin observarse modificaciones significativas en IL-1 β . Se objetiva así mismo, aumento de la PCR y consumo del C3 y C4.
2. La infección por el serotipo 4 del dengue se asocia a un mayor incremento sérico de IL-6, DENV-2 con un aumento de PCR y DENV-3 con el de C3 y C4. No se observa una asociación con mayor variación de los tres serotipos citados con respecto a los niveles de TNF- α .
3. Los niveles séricos de NO están aumentados en la infección por dengue y se relacionan con la forma clínica de la enfermedad, siendo mayores en el DC que en el DH, y en infecciones secundarias más que en las primarias.
4. Los monocitos de individuos sanos (neonatos, adultos jóvenes y ancianos) revelan diferente patrón de respuesta a la infección por el virus dengue. Los monocitos procedentes de adultos jóvenes muestran una mayor producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , y de CAT y GSH, mientras que en los ancianos de SOD. Existe heterogeneidad entre la intensidad del efecto sobre

la producción de citoquinas y el estrés oxidativo en los monocitos de individuos sanos infectados por los cuatro serotipos del DENV.

5. Los diferentes serotipos del virus dengue indujeron similar nivel de apoptosis en los monocitos procedentes de individuos sanos, neonatos, adultos jóvenes y ancianos.

Tomado en conjunto, se concluye que la infección por el DENV, se asocia a una intensa respuesta inflamatoria/sistémica, ejerciendo una intensa señalización pro-inflamatoria inductora de estrés oxidativo y apoptosis sobre los monocitos con diferentes patrones de susceptibilidad según la edad del individuo.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K, Lichtman A.H., Pillai, S. Citoquinas en: ***Inmunología celular y molecular***. Elsevier. 267-301, 2009.
2. Albina E., Cui S., Mateo R., Reichner J. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophage. ***J Immunol***. 150: 5080-5085, 1993.
3. Alvarez-Mon M., Kehrl JH., Fauci AS. A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocytic functions. ***J Immunol***. 135: 3823-6, 1985.
4. Anderson R., Wang S., Osiowy C., Issekutz A. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. ***J Virol***. 71: 4226-4232, 1997.
5. Añez G. Evolución molecular del virus dengue: un área de investigación prioritaria. ***Invest clín***. 48 (3): 273-276, 2007.
6. Akarid K., Sinet M., Desforges B., Gougerot-Pocidalo MA. Inhibitory effect of nitric oxide on the replication of a murine retrovirus in vitro and in vivo. ***J Virol***. 69: 7001–7005, 1995.
7. Akira S., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). ***FASEB J***. 4: 2860-2867, 1990.
8. Avirutnan P., Malasit P., Seliger B., Bhakdi S., Husmann M. Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Leads to Chemokine Production, Complement Activation, and Apoptosis. ***The Journal of Immunology***. 161: 6338-6346, 1998.
9. Avirutnan P., Mehlhop E., Diamond MS. Complement and its Role in Protection and Pathogenesis of Flavivirus Infections. ***Vaccine***. 26 (8): I100–I107, 2008.
10. Aziz N., Fahey J., Detels R., Butch A. Analytical Performance of a Highly Sensitive C-Reactive Protein Based Immunoassay and the Effects of Laboratory Variables on Levels of Protein in Blood. ***Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology***. 10 (4): 652-657, 2003.
11. Bachmann F. and Kruithof E.K.O. Tissue plasminogen activator: Chemical and physiological aspects. ***Semin. Thromb. Hemost.*** 10: 6-17, 1984.
12. Balta R. Guía práctica para la identificación de *Aedes aegypti*. Lima: Instituto Nacional de Salud. ***Serie de Guías Entomológicas***. 2, 1997.
13. Bandyopadhyay S., Lum LC., Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. ***Tropical Medicine and International Health***. 11 (8): 1238-1255, 2006.

14. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death Differ.** 8:113-126, 2001.
15. Barton BE. The biological effects of interleukine-6. **Med. Res. Rev.** 16: 87-109, 1996.
16. Beckman JS., Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol Cell Physiol.** 271 (5): 1424-1437, 1996.
17. Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, Leroy EM. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. **BMC Infect Dis.** 10:356, 2010.
18. Benzi G., Moretti A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. **Free Rad Biol Med.** 19 (1): 77-101, 1995.
19. Berckerman K., Rogers W., Corbett J., Schreiber R., McDaniel M., Unanue E. Release of nitric oxide during T-cell independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. **J. Immunology.** 150: 888-895, 1993.
20. Bergold G.H., Mazzali R. Plaque formation by arbovirus. **J Gen Virol.** 2:273-284, 1968.
21. Bethell DB., Flobbe K., Phuong CXT., Day NPJ., Phuong TT., Buurman WA., Cardoso MJ., White NJ. Pathophysiological and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** 177: 778-782, 1998.
22. Bhamarapravati N., Tuchinda P., Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: A study of 100 autopsy cases. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 61: 500-510, 1967.
23. Bi Z., Reiss CS. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. **J Virol.** 69 (4): 2208-2213, 1995.
24. Bokisch VA., Top FH Jr., Russell PK., Dixon FJ., Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. **N Engl J Med.** 289: 996-1000, 1973.
25. Boussemart T., Babe P., Sibille G., Neyret C., Berchel C. Prenatal transmission of dengue: two new cases. **J Perinatol.** 21 (4): 255-7, 2001.
26. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand J Clin Lab Invest.** 21(97):77, 1968.
27. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infect Dis.** 8:86, 2008.

28. Braga EL., Moura P., Pinto LM., Ignacio SR., Oliveira MJ., Cordeiro MT., Kubelka CF. Detection of circulant tumor necrosis factor- α , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon- γ in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 96: 229-232, 2001.
29. Bray M., Men R., Tokimatsu I., Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. **J Virol.** 72 (2): 1647-51, 1998.
30. Burke DS., Nisalak A., Johnson DE., Scott RM. A prospective study of dengue infection in Bangkok. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 38: 172-180, 1988.
31. Calisher CH., Karabatsos N., Dalrymple JM., Shope RE., Porterfield JS., Westaway EG., et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by crossneutralization tests with polyclonal antisera. **J Gen Virol.** 70 (1): 37-43, 1989.
32. Cardier J., Mariño E., Romano E., Taylor P., Liprandi F., Bosch N., Rothman A. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cell damage in dengue. **Cytoquine.** 30: 359-365, 2005.
33. Castell JV., Gomez-Lechon MJ., David M., Fabra R., Trullenque R., Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology.** 12 (5):1179-86, 1990.
34. Centers for Disease Control and Prevention. Travel-associated dengue – United States, 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report.** 55 (25): 700-702, 2006.
35. Cerdá C., Sáez G. Implicaciones fisiopatológicas del estrés oxidativo fetal. <http://93.189.33.183/index.php/mono/article/viewFile/616/633>. 2010.
36. Céspedes M., Ela M. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. **Rev Cubana Inv Biomed.** 15 (2): 75-8, 1996.
37. Chambers TJ., Hahn CS., Galler R., Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Ann Rev Microbiol.** 44: 649-88, 1990.
38. Chakravarti A., Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor- α & interferon- γ in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **Indian J Med Res.** 123: 25-30, 2006.
39. Chambers TJ., Hahn CS., Galler R., Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and

- p>replication.
- Ann Rev Microbiol.**
- 44: 649-88, 1990.
40. Chaturverdi U., Shrivastava R., Nagar R. Dengue vaccines: Problems & prospects. **Indian J Med Res.** 121: 639-652, 2005.
 41. Chen YC., Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. **J Virol.** 76 (19): 9877-87, 2002.
 42. Chesler DA., Dodard C., Lee GY., Levy DE., Reiss CS. Interferon-gamma-induced inhibition of neuronal vesicular stomatitis virus infection is STAT1 dependent. **J Neurovirol.** 10 (1): 57-63, 2004.
 43. Chotigeat U., Kalayanaroj S., Nisalak A. Vertical transmission of dengue infection in Thai infants: two case reports. **J Med Assoc Thai.** 86 (3): 628-32, 2003.
 44. Chungue E., Deubel V., Cisar O., Laille M., Martin MV. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. **J Gen Virol.** 74: 2765-70, 1993.
 45. Colten H. R. Biosynthesis of complement. **Adv. Immunol.** 22: 67-118, 1976.
 46. Courageot M.-P and Despre's P. Viroses humaines et apoptose. **Ann. Inst. Pasteur/Actualite's.** 11: 79-93, 2000.
 47. Croen K. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. **J. Clin. Invest.** 91: 2446-2452, 1993.
 48. Curfs J.H.A.J., Meis J.F.G.M., Hoogkamp-Korstanje J.A.A. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. **Clinical microbiology reviews.** 10 (4): 742-780, 1997.
 49. Danh HC., Strolin BM., Dostert P. Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. **J Neurochem.** 46: 1344-52, 1986.
 50. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem.** 52:601-623, 2006.
 51. Della Bella S., Bierti L., Presicce P., Arienti R., Valenti M., Saresella M, *et al.* Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. **Clinical Immunology.** 122, 220-228, 2007.
 52. Denton J., Cheung S., Nesin M., Lin H., Tatad F., Hoang D., Perlman J., Cunningham-Rundles S. Neonatal Cord Blood Subsets and Cytokine Response to Bacterial Antigens. **American**

- Journal of Perinatology.** 26 (9), 2009.
53. Duchini A., Govindarajan S., Santucci M., Zampi G., Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin- 6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS derived endothelial cells. **J Invest Med.** 44: 474-482, 1996.
 54. Eram S., Setyabudi Y., Sadono T. I., Sutrisno D. S., Gubler D. J., Sulianti-Saroso J. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia: clinical studies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 28: 711–716, 1979.
 55. Espina LM., Valero NJ., Hernández JM., Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. **Am J Trop Med Hyg.** 68 (1): 48-23, 2003.
 56. Expósito LA., Kokoszka JE., Waymire KG. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. **Free Radic Biol Med.** 28 (5): 754-66, 2000.
 57. Fink J, Gu F, Vasudevan SG Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **Rev Med Virol.** 16(4):263-75, 2006.
 58. Gabay C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N Engl J Med.** 340 (6): 448-54, 1999.
 59. Gerschenson LE., Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.** 6: 2450-2455, 1992.
 60. Gibbons R., Vaughn D. Dengue: an escalating problem. **BMJ.** 324: 1563-1566, 2002.
 61. Gil L., Martínez G., Tapanes R., Castro O., González D., Bernardo L., Vázquez S., Kourí G., Guzmán MG. Oxidative stress in adult dengue patients. **Am J Trop Med Hyg.** 71 (5): 652-7, 2004.
 62. González A., Martínez R., Villar L. Evolución Clínica de Pacientes Hospitalizados por Dengue en una Institución de salud de Bucaramanga, Colombia. **Biomédica.** 28: 531-43, 2008.
 63. Gubler DJ., Reed D., Rosen L., Hitchcock JR Jr. Epidemiologic, clinical and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 27: 581–589, 1978.
 64. Gubler DJ., Suharyono W., Tan R., Abidin M., Sie A. Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. **Bull World Health Organ.** 59 (4): 623–630, 1981.
 65. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. **P R Health Sci J.** 6: 107-111, 1987.
 66. Gubler D.J. Dengue, p. 223–260. In T. P. Monath (ed.), *Epidemiology of arthropod-borne*

- viral diseases. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1988.
67. Gubler D.J., and Casta-Velez A. A program for prevention and control of epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. **Bull. Pan Am. Health Org.** 25: 237–247, 1991.
 68. Gubler D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem, p. 1–22. In D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International, London, United Kingdom. 1997.
 69. Gubler D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Rev.** 11 (3): 480-496, 1998.
 70. Guirakhoo F., Arroyo J., Pugachev KV., Miller C., Zhang ZX., Weltzin R., Georgakopoulos K., Catalan J., Ocran S., Soike K., Ratterree M., Monat TP. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **J Virol.** 75: 7290-7304, 2001.
 71. Gupta A., Hasan M., Chander R. Age related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the CNS of rats. **Gerontology.** 37: 305-9, 1991.
 72. Gutiérrez J., Cruz L. Determinación de enzimas antioxidantes y malondialdehído en el suero de niños con IgM positiva para citomegalovirus. **Acta Pediatr Méx.** 30 (2): 77-83, 2009.
 73. Gutiérrez-Salinas J. Qué sabe usted acerca de radicales libres?. **Rev Mex Cien Farm.** 37:69-73, 2006.
 74. Guzmán M., Kouri G., Bravo J., Soler M., Vázquez S., Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. **Am J Trop Med Hyg.** 42 (2): 179-184, 1990.
 75. Hack C., De Groot E., Felt-Bersma R., Nuijens J., Strack Van Schijndel R., Eerenberg-Belmer A., Thijs L., Aarden L. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. **Blood.** 74 (5): 1704-1710. 1989.
 76. Hack C., Aarden L., Thijs L. Role of cytokines in sepsis. **Adv immunol.** 66: 101-195, 1997.
 77. Hallwirth U., Pomberger G., Pollak A., Roth E., Spittler A. Monocyte switch in neonates: high phagocytic capacity and low HLA-DR expression in VLBWI are inverted during gestational aging. **Pediatr Allergy Immunol.** 15 (6): 513-6, 2004.
 78. Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever—public health problem and a field for research. **Bull. W. H. O.** 58: 1–21, 1980.

79. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**. 239:476–481, 1988.
80. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Rev Infect Dis**. 11 (4): 830-9, 1989.
81. Halstead, S.B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **Rapp. Trimest. Stat. Sanit. Mond**. 45: 292-298, 1992.
82. Halstead, SB. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. p. 23-44. In D.J. Gubler and G. Kuno (ed). Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1997.
83. Halstead S and Deen J. The future of dengue vaccines. **The Lancet**. 360: 1243-45, 2002.
84. Halstead S., Heinz F., Barrett A., Roehring J. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25 – 27 June 2003, Vienna, Austria. **Vaccine**. 2: 849-856, 2005.
85. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? **Rev Panam Salud Pública**. 6: 407-15, 2006.
86. Han P., McDonald T., Hodge G. Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. **Immunology**. 113 (1): 26-34, 2004.
87. Hardwick J.M. Viral interference with apoptosis. **Semin. Cell Dev. Biol**. 9: 339-349, 1998.
88. Hehlhans T., Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**. 115 (1): 1-20, 2005.
89. Heinrich P., Castell J., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem. J**. 265: 621-636, 1990.
90. Herbein G., O'Brien W. Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and TNF Receptors in Viral Pathogenesis. **Society for Experimental Biology and Medicine**. 223: 241-257, 2000.
91. Hirsch R.L. The complement system: its importance in the host response to viral infection. **Microbiol. Rev**. 46: 71-85, 1982.
92. Hober D., Poli L., Roblin B., Gestas P., Chungue E., Granic G., Imbert P., Pecarere J., Verguez-Pascal R., Wattre P. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. **Am J trop Med Hyg**. 48 (3): 324-331, 1993.

93. Hober D., Nguyen TL., Shen L., Ha DQ., Huong VT., Benyoucef S., Nguyen TH., Bui TM., Loan HK., Le BL., Bouzidi A., De Groote D., Drouet MT., Deubel V., Wattré P. Tumor necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients: relationship between virus detection and pre-existing specific antibodies. **J Med Virol.** 54: 210-218, 1998.
94. Hodge S., Hodge G., Flower R., Han P. Cord blood leukocyte expression of functionally significant molecules involved in the regulation of cellular immunity. **Scand J Immunol.** 53: 72-78, 2001.
95. Hombach J. Vacunas contra el dengue: Una revisión de las vacunas candidatas en etapas avanzadas de desarrollo. **Rev Panam Salud Pública.** 21(4): 254-260, 2007.
96. Hotta S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification, and modification of the virus. **J Infect Dis.** 90: 1-9, 1952.
97. Hoyos A., Pérez A. Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. **Revista Cubana de Salud Pública.** 36 (1): 149-164, 2010.
98. Huang K.J., Li S.Y. J., Chen S.C., Liu H.S., Lin Y.S., Yeh T.M., Liu C.C., Lei H.Y. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. **J. Gen. Virol.** 81: 2177-2182, 2000.
99. Huan-Yao L., Trai-Ming Y., Hsiao-Sheng L., Yee-Shin L. Immunopathogenesis of Dengue virus Infection. **Journal Biomed Sci.** 8: 377-387, 2001.
100. Huang Y.H., Liu C.C., Wang S.T., Lei H.Y., Liu H.S., Lin Y.S., Wu H.L., Yeh T.M. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. **J. Med. Virol.** 63: 247-251, 2001.
101. Innis BL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, p. 103–146. In J. S. Porterfield (ed.), **Exotic viral infections**-1995. Chapman & Hall, London, United Kingdom. 1995.
102. Iyngkaran N., Yadav M., Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. **Singapore Med J.** 36 (2): 218-221, 1995.
103. Jaeschke H., Farhood A., Cai SX., Tseng BY., Bajt AL. Protection against TNF-induced liver parenchymal cell apoptosis during endotoxemia by a novel caspase inhibitor in mice. **Toxicol Appl Pharmacol.** 169: 77-83, 2000.
104. Jakoby WB., Ziegler DM. The enzymes of detoxication. **J Biol Chem.** 265: 20715-8, 1990.
105. Janjindamai W., Pruekprasert P. Perinatal dengue infection: a case report and review of literature. **Southeast Asian J**

- Trop Med Public Health.** 34 (4): 793-6, 2003.
106. Jiang H., Van de Ven C., Satwani P., Baxi LV., Cairo MS. Differential Gene Expression Patterns by Oligonucleotide Microarray of Basal versus Lipopolysaccharide-Activated Monocytes from Cord Blood versus Adult Peripheral Blood. **J Immuno.** 172: 5870–5879, 2004.
 107. Juffrie M., Meer G., Hack C., Thus L. Inflammatory mediators in Dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **Am J Trop Med Hyg.** 65 (1): 70-75, 2001.
 108. Kao Ch., King Ch., Chao D., Wu H., Chang G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J Microbiol Immunol Infect.** 38: 5-16, 2005.
 109. Karupih G., Xie Q., Buller M., Nathan C., Duarte C., MacMicking J. Inhibition of viral replication by interferon induced nitric oxide synthase. **Science.** 261: 1445-1448, 1993.
 110. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. 1998. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent host. **Clin Diagnost Lab Immunol.** 5(1): 78-81, 1998.
 111. Kerdpanich A., Watanaveeradej V., Samakoses R., Chumnarnvanakij S., Chulyamitporn T., Sumeksri P., Vuthiwong C., Kounruang C., Nisalak A., Endy T. Perinatal dengue infection. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 32 (3): 488-93, 2001.
 112. Keyaerts E., Vijgen L., Chen L., Maes P., Hedenstierna G., Van Ranst M. Inhibition of SARS-coronavirus infection in vitro by S-nitroso-N-acetylpenicillamine, a nitric oxide donor compound. **Int J Infect Dis.** 8 (4): 223-226, 2004.
 113. Khare M., Chaturvedi UC. Role of nitric oxide in the transmission of dengue virus specific suppressor signal. **Indian J Exp Biol.** 35: 855-860, 1997.
 114. King CA., Marshall JS., Alshurafa H., Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. **J Virol.** 74: 7146-50, 2000.
 115. Klassen P., Biesalski HK., Mazariegos M., Solomons NW., Fürst P. Classic Dengue Fever Affects Levels of Circulating Antioxidants. **Nutrition.** 20: 542-547, 2004.
 116. Kliks S., Nisalak CA., Brandt WE., Wahl L., Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue

- hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 40: 444-451, 1989.
117. Klingstrom J., Akerstrom S., Hardestam J., Stoltz M., Simon M., Falk KI., Mirazimi A., Rotternberg M., Lundkvist A. Nitric oxide and peroxynitrite have different antiviral effects against hantavirus replication and free mature virions. **Eur J Immunol.** 36 (10): 2649-2657, 2006.
 118. Konstantin P., Farshad D., Trent T. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. **International Journal for Parasitology.** 33: 567-582, 2003.
 119. Kou Z., Quinn M., Chen H., Shanaka R., Rose R., Schlesinger J., Jin X. Monocytes, But Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus (DV) Infection Among Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Journal of Medical Virology.** 80: 134-146, 2008.
 120. Koyana H., Fukumori T., Fujita M., Irie H., Adachi A. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. **Microbes and Infection.** 2: 1111-1117, 2000.
 121. Kurane I., Ennis FA. Cytokines in dengue fever virus infection: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Semin Virol.** 5: 443-448, 1994.
 122. Kuno G., Bailey R. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.** 89 (2): 179-182, 1994.
 123. Kurane I., Rothman A., Livingston P., Green S., Gagnon S., Janus J., Innis B., Nimmannitya S., Nisalak A., Ennis F. Immunopathologic mechanism of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **Arch. Virol.** 9: 59-64, 1994.
 124. Lanciotti R., Calisher Ch., Gubler D., Chang D., Vorndamt G. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of clinical Microbiology.** 30 (3): 545-551, 1992.
 125. Lanciotti RS., Lewis JG., Gubler DJ., Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **J Gen Virol.** 75 (1): 65-75, 1994.
 126. La Russa VF., Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. **Baillieres Clin. Haem.** 8: 249-270, 1995.
 127. Lee YR., Lei HY., Liu MT., Wang JR., Chen SH., Jiang-Shieh YF., Lin YS., Yeh TM., Liu CC., Liu HS. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. **Virology.** 374 (2): 240-8, 2008.

128. Lei H., Yeh T., Liu H., Lin Y., Chen S., Liu C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **J Biomed Sci.** 8: 377-88, 2001.
129. Lei H-Y., Huang K-J., Lin Y-S., Yeh T-M., Liu H-S., Liu C-C. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Infect. Dis.** 4 (1): 1-9, 2008.
130. Leitmeyer K., Vaughn D., Watts D., Salas R., Villalobos I., Ramos C., Rico-Hesse R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology.** 73 (6): 4738-4747, 1999.
131. Levy A., Valero N., Espina LM., Añez G., Arias J., Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumor necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 104:16-23, 2010.
132. Levy O., Zarembek KA., Roy RM., Cywes C., Godowski PJ., Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. **J Immunol.** 173 (7): 4627-34, 2004.
133. Lewis JA., Chang GJ., Lanciotti RS., Kinney RM., Mayer L., Trent D. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology.** 197 (1): 216-24, 1993.
134. Lidbury BA., Mahalingam S. Specific ablation of antiviral gene expression in macrophages by antibody-dependent enhancement of Ross River virus infection. **J Virol.** 74 (18): 8376-8381, 2000.
135. Lin YL., Huang YL., Ma SH., Yeh CT., Chiou SY., Chen LK., Liao CL. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. **J Virol.** 71 (7): 5227-5235, 1997.
136. Lin CF., Lei HY., Liu CC., Liu HS., Yeh TM., Wang ST., Yang TI., Sheu FC., Kuo CF., Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. **J. Med. Virol.** 63: 143-149, 2001.
137. Lin C.F., Wan S.W., Cheng H.J., Lei H.Y., Lin Y.S. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. **Viral Immunol.** 19: 127-132, 2006.
138. Mackenzie JM., Jones MK., Young PR. Immunolocalization of the dengue virus non-structural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology.** 220 (1): 232-40, 1996.
139. Madeira N., Macharelli CA., Pedras JF., Delfino M. Education in primary school as a strategy to

- control dengue. **Rev Soc Bras Med Trop.** 35 (3): 221-6, 2002.
140. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 18 (3): 316-20, 1987.
 141. Malorni W., Rivabene R., Isosi F., Paradisi S., Santini MT., Donelli G. A study of TNF-mediated apoptosis in HIV-infected U937 cells [resumen]. **Berlín: IX Internacional Conference on AIDS** (vol. I); junio 6-11; Po A12-0208, 1993.
 142. Marianneau P., Flamand M., Deubel V., Després P. Induction of Programmed Cell Death (Apoptosis) by Dengue Virus *In Vitro* and *In Vivo*. **Acta Científica Venezolana.** 49 (1): 13-17, 1998.
 143. Marianneau P., Flamand M., Deubel V., Després P. Apoptotic cell dead in response to dengue virus infection: the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. **Clin Diagn Virol.** 10: 113-119, 1998.
 144. Marianneau P., Steffan AM., Royer C., Drouet MT., Jaeck D., Kirn A., Deubel V. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. **J Virol.** 73 (6): 5201-6, 1999.
 145. Mo JQ., Hom DG., Andersen JK. Decreases in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. **Mech Ag Dev.** 81: 73-82, 1995.
 146. Monath TP. Pathobiology of the flaviviruses, p. 375-440. In S. Schlesinger and M. J. **Schlesinger** (ed.), *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum, New York, N.Y. 1986.
 147. Monath, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91 (7): 2395-2400, 1994.
 148. Monath TP., Tsai T. Flavivirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. **Clinical Virology**. New York: Churchill Livinstone Inc; p.1133-85, 1997.
 149. Monath TP., Myers GA., Beck RA., Knauber M., Scappaticci K., Pullano T., Archambault WT., Catalan J., Miller C., Zhang ZX., Shin S., Pugachev K., Draper K., Levenbook IS., Guirakhoo F. Safety testing for neurovirulence of novel live, attenuated flavivirus vaccines: infant mice provide an accurate surrogate for the test in monkeys. **Biologicals.** 33 (3): 131-44, 2005.
 150. Moncada S., Palmer M., Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: 109-142, 1991.
 151. Morbidity and Mortality Weekly Report. Dengue Type 3 Infection-Nicaragua and

- Panamá. **MMWR**. 44 (2): 21-3, 1995.
152. Morens DM., Halstead SB. Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. **J. Gen. Virol.** 71: 2909-2914, 1990.
 153. Mosquera JA., Hernández JP., Valero N., Espina LM., Añez GJ. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. **Virol J.** 2 (1): 26, 2005.
 154. Naqui A., Britton C., Cadenas E. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. **Annu Rev Biochem.** 55: 137-66, 1996.
 155. Nathan C., Hibbs J. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.** 3: 65-70, 1991.
 156. Navarro JC., Zorilla A., Moncada N. Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) en Venezuela: Importancia como vector de Dengue y acciones a desarrollar. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental.** 49 (1): 161-166, 2009.
 157. Neves-Sousa P., Azeredo E., Zagne S., Valls-de-Souza R., Reis S., Cerqueira D., Nogueira R., Kubelka C. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expresión in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. **BMC Infectious Diseases.** 5: 64, 2005.
 158. Nielsen F., Mikkelsen BB., Nielsen JB., Andersen HR., Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clin Chem.** 43:1209-14, 1997.
 159. Niwa M., Hara A., Kanamori Y., Hatakeyama D., Saito M., Takami T., Matsuno H., Kozawa O., Uematsu T. Nuclear Factor-kappa B activates dual inhibition sites in the regulation of tumor necrosis factor – alpha – induced neutrophil apoptosis. **Eur J Pharmacol.** 407: 211-219, 2000.
 160. O'Brien V. Viruses and apoptosis. **J. Gen. Virol.** 79: 1833-1845, 1998.
 161. OMS. Dengue y Dengue Hemorrágico en Las Américas: Guías para su Prevención y Control, 1995.
 162. Organización Mundial de la salud. **Dengue: guía para estudio, tratamiento, prevención y control**, 2009.
 163. Organización Panamericana de la Salud. Definiciones de casos. Dengue. **Boletín Epidemiológico.** 21: 14-5, 2000.
 164. Organización Pan Americana de la Salud: Dengue y fiebre hemorrágica del dengue.

- Boletín Epidemiológico.** 17 (4): 12-4, 1996.
165. Pan American Health Organization. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Scientific Publication No. 548. Washington: PAHO; 1994.
 166. PAHO. Plan continental de ampliación e intensificación del combate al *Aedes aegypti*. Informe de un grupo de trabajo, Caracas, Venezuela. Abril 1997. Washington, DC, Pan American Health Organization, 1997 (Document OPS/HCP/HCT/90/97, in Spanish) (<http://www.paho.org/Spanish/A/D/DPC/CD/doc407.pdf>).
 167. PAHO. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Washington, DC, Pan American Health Organization, 2008. (<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>).
 168. Panyasrivanit M., Khakpoor A., Wikan N., Smith DR. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. **J Gen Virol.** 90 (2): 448-56, 2009.
 169. Peña C., Rincon J., Pedreanez A., Viera N., Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. **J Pineal Res.** 43 (3): 263-9, 2007.
 170. Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: mechanisms and metabolic regulations. **J Nutr.** 127:962S-965S, 1997.
 171. Petdachai W., Sila'on J., Nimmannitya S., Nisalak A. Neonatal dengue infection: report of dengue fever in a 1-day-old infant. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 35 (2): 403-7, 2004.
 172. Pillay V., Savage N., Laburn H. Circulating cytokine concentrations and cytokine production by monocytes from newborn babies and adults. **Pfiftigers Arch.** 428:197-201, 1994.
 173. Pinto L., Oliveira S., LA Braga E., Nogueira R., Kubelka C. Increased Pro-inflammatory Cytokines (TNF- α and IL-6) and Anti-inflammatory Compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian Patients during Exantematic Dengue Fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.** 94 (3): 387-394, 1999.
 174. Pober JS., Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. **Physiol Rev.** 70: 427-451, 1990.
 175. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. **PLoS One.** 5(1):e8709, 2010.

176. Ramírez-Ronda CH., García CD. Dengue in the western hemisphere. Diseases of Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 8 (1): 107-28, 1994.
177. Rao G., Xia E., Richardson A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fisher F344 rats. *Mech Ag Dev.* 53: 49-60, 1990.
178. Raschilas F. Infectious disease epidemiology in the elderly. *Soins Gerontol.* 61: 22-6, 2006.
179. Ray G., Kumar V., Kapoor AK., Dutta AK., Batra S. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *J Trop Pediatr.* 45 (1): 4-7, 1999.
180. Reitter RJ. Oxidative processes and antioxidative mechanisms. *FASEB J.* 9: 526-33, 1995.
181. Restifo NP. Building better vaccines: how apoptotic cell dead can induce inflammation and active innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 12: 597-603, 2000.
182. Rich EA., Mincek MA., Armitage KB., Duffy EG., Owen DC., Fayen JD., Hom DL., Ellner JJ. Accessory function and properties of monocytes from healthy elderly humans for T lymphocyte responses to mitogen and antigen. *Gerontology.* 39(2):93-108, 1993.
183. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 174 (2): 479-93, 1990.
184. Rico-Hesse R., Harrison L., Salas R., Tovar D., Nisalak A., Ramos C., Boshell J., Rde Mesa M., Nogueira R., Travassos da Rosa A. Origins of dengue 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 230: 244-251, 1997.
185. Rico-Hesse R., Harrison L., Nisalak A., Vaugh D.W., Kalayanarooj S., Green S., Rothman A.L., Ennis F.A. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 96-101, 1998.
186. Rodríguez K., Céspedes E. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed.* 18 (2): 67-76, 1999.
187. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzy P., et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 6: 315-325, 1997.
188. Rosen L., Gubler D. J. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:1153-1160, 1974.
189. Rothman A. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of*

- Clinical Investigation.** 113 (7): 96-951, 2004.
190. Roulston A., Marcellus R.C.; Branton, P.E. Viruses and apoptosis. **Annu. Rev. Microbiol.** 53: 577-628, 1999.
 191. Ruangjirachuporn W., Boonpucknavig S., Nimmanitya S. Circulating immune complexes in serum from patients with dengue haemorrhagic fever. **Clin. Exp. Immunol.** 36: 46-53, 1979.
 192. Salas R., Tovar D., Barreto A., De Miller E., Leitmeyer K., Rico-Hesse R. Serotipos y Genotipos de Virus Dengue Circulantes en Venezuela, 1990 – 1997. **Acta Científica Venezolana.** 49 (1): 33-37, 1998.
 193. Saxena SK., Singh A., Mathur A. Antiviral effect of nitric oxide during Japanese encephalitis virus infection. **Int J Exp Pathol.** 81 (2): 165-172, 2000.
 194. Shaio M., Cheng S., Yuh Y., Yang K. Cytotoxic factors released by dengue virus-infected human blood monocytes. **J. Med Virol.** 46 (3): 216-223, 1995.
 195. Scherer W. E., Russell P. K., Rosen L., Casals J., Dickerman R. W. Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 27: 590-599, 1978.
 196. Seidler S., Zimmermann H., Bartneck M., Trautwein C., Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. **BMC Immunology.** 11:30, 2010.
 197. Sheldon J., Riches P., Gooding R., Soni N., Hobbs R. C-Reactive Protein and its Cytokine Mediators in Intensive-Care Patients. **Clin Chem.** 39 (1): 147-150, 1993.
 198. Shen Y., Shenk T.E. Viruses and apoptosis. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 5: 105-111, 1995.
 199. Shu P., Huang J. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 11 (4): 642-650, 2004.
 200. Simon M., Falk KI., Lundkvist A., Mirazimi A. Exogenous nitric oxide inhibits Crimean Congo hemorrhagic fever virus. **Virus Res.** 120 (1-2): 184-190, 2006.
 201. Sirinavin S., Nuntnarumit P., Supapannachart S., Boonkasidecha S., Techasaensiri C., Yoksarn S. Vertical dengue infection: case reports and review. **Pediatr Infect Dis J.** 23 (11): 1042-7, 2004.
 202. Sohal RS., Allen RG. Relationship between oxygen metabolism, aging and development. **Adv Free Rad Biol Med.** 2: 117-60, 1986.
 203. Sohal RS., Arnold LA., Sohal BH. Aged-related changes in antioxidants enzymes and pro-

- oxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad Biol Med*. 10: 495-500, 1990.
204. Sohal RS., Agarwal S., Sohal BH. Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mech Ag Dev*. 81 (1): 15-25, 1995.
 205. Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue virus, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg*. 28 (6): 1053-1059, 1979.
 206. Thaithumyanon P., Thisyakorn U., Deerojnawong J., Innis BL. Dengue infection complicated by severe hemorrhage and vertical transmission in a parturient woman. *Clin Infect Dis*. 18 (2): 248-9, 1994.
 207. Thein S. **Risk factors in dengue haemorrhagic fever.** Thesis of Doctor of Philosophy in Tropical health program. 1994.
 208. Thomas JA. Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. *Modern nutrition in health and disease*. 8 ed. Williams and Wilkins; Philadelphia. 501-12, 1994.
 209. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis S, Miranda AS, Gardini M, Barbosa LS, Kubelka CF. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 (8): 1091-1099. 2009.
 210. Torzewski J., Torzewski M., Bowyer DE., Frohlich M., Koenig W., Waltenberger J., Fitzsimmons C., Hombach V. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18 (9):1386-1392, 1998.
 211. Turrens J. Fuentes intracelulares de especies oxidativas en condiciones normales y patológicas. *Antioxidantes y Calidad de Vida*. 1: 16-9, 1994.
 212. Valero N., Espina LM., Añez G., Torres E., Mosquera JA. Short Report: Increased level of nitric oxide in patients with Dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 66 (6): 762-764, 2002.
 213. Valero N., Levy A. Perspectivas futuras en el desarrollo de vacunas para dengue. *Invest. clín*. 49 (2): 135-138, 2008.
 214. Van Gorp E.C.M., Shuarti C., ten Cate H., Dolmans W.M.V., van der Meer J.W. M., ten Cate J.W., Brandjes D.P.M. Review: Infectious diseases and coagulation disorders. *J. Infect. Dis*. 180: 176-186, 1999.
 215. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol*. 10: 411-53, 1992.
 216. Vaughn D., Green S., Kalayanarooj S., Innis B., Nimmannitya S., Suntayakorn S. Dengue in the early febrile

- phase: viremia and antibody response. *J. Infect. Dis.* 176: 322-330, 1997.
217. Vaughn D., Green S., Kalayanarooj S., Innis B., Nimmannitya S., Suntayakorn S., *et al.* Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases.* 181: 2-9, 2000.
 218. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31 (2): 126-33, 2002.
 219. Vorndam V., Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. p. 313-333. In Gubler DJ; Kuno, G (ed). Dengue and dengue hemorrhagic fever. 1997. CAB International, London, United Kingdom. 1997.
 220. Walport M. Complement. First of Two Parts. *N Engl J Med.* 344 (14): 1058-1066, 2001.
 221. Wang S., He R., Patarapotikul J., Innis BL., Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology.* 213: 254-257, 1995.
 222. Warner HR. Superoxide dismutase, aging and degenerative diseases. *Free Rad Biol Med.* 7 (3): 249-58, 1994.
 223. Wati S., Li P., Burrell C., Carr J. Dengue Virus (DV) Replication in Monocyte-Derived Macrophages Is Not Affected by Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), and DV Infection Induces Altered Responsiveness to TNF- α Stimulation. *Journal of Virology.* 81 (18): 10161-10171, 2007.
 224. Whitehead S., Blaney J., Durbin A., Murphy B. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature.* 5: 518-528, 2007.
 225. Williams KL., Zompi S., Beatty PR., Harris E. A mouse model for studying dengue virus pathogenesis and immune response. *Ann N Y Acad Sci.* 1171 (1): 12-23, 2009.
 226. Winch P., Kendall C., Leontsini E. Community participation in Aedes aegypti control programmes. In: Uren MF, Blok J, Manderson LH, editors. Arbovirus Research in Australia: proceedings Fifth Symposium, August 28, Brisbane, Australia. Brisbane: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 224-8, 1990.
 227. Wittmann M, Larsson V, Schmidt P, Begemann G, Kapp A, and Werfel T. Suppression of Interleukin-12 Production by Human Monocytes After Preincubation With Lipopolysaccharide. *Blood.* 94(5) 1717-1726, 1999.
 228. World Health Organization. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.* 2nd ed.

World Health Organization,
Geneva, Switzerland. 1997.

ction316/Section503/Section246
3_14619.htm).

229. WHO. Dengue in India. **Weekly Epidemiological Record**. 79 (21): 201-203, 2004. ([http://whqlibdoc.who.int/wer/WHO_WER_2004/79_201-204\(21\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/wer/WHO_WER_2004/79_201-204(21).pdf)).
230. WHO. Revision of the International Health Regulations. World Health Assembly Resolution WHA58.3, adopted by the 58th World Health Assembly, 2005 (http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf).
231. WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117, revised May 2008. Geneva, World Health Organization, 2008 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).
232. WHO/WPRO. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever prevention and control. Regional Committee resolution WPR/RC59.R6, adopted by the WHO Regional Committee for the Western Pacific, 2008 (http://www.wpro.who.int/rcm/en/rc59/rc_resolutions/WPR_RC59_R6.htm).
233. WHO/SEARO. Concrete measure key in controlling dengue in South East Asia. Press Release SEA/PR/1479. New Delhi, World Health Organization Regional Office for South-East Asia, 2008. (http://www.searo.who.int/EN/Section316/Section503/Section2463_14619.htm).
234. WHO. Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention And Control. 2009
235. Yaday M., Kamath K., Iyngkaran N., Sinniah M. Dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome: are they tumour necrosis factor-mediated disorders?. **FEMS Microbiol Immunol**. 4 (1): 45-49, 1991.
236. Yang K., Lee C., Hwang K., Chu M., Shaio M. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary dengue-2 virus infections. **Acta Virol**. 39: 19-21, 1995.
237. Yoshikawa T. Introduction to serial reviews: vascular dysfunction and free radicals. **Free Radic Biol Med**. 33 (4): 425-6, 2002.
238. Yue C., Muller-Greven J., Dailey P., Lozanski G., Anderson V., Macintyre S. Identification of a C-reactive Protein Binding Site in Two Hepatic Carboxylesterases Capable of Retaining C-reactive Protein within the Endoplasmic Reticulum. **J. Biol. Chem**. 271: 2245-2250, 1996.
239. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart DN., *et al*. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**. 116 (16), 2010.